

BESTIMMUNG DER SERUM- UND BLUTSPIEGEL
von 81.723 hfu bei verschiedenen Vogelarten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde des
Fachbereiches Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von

Kuno-Alexander von Plocki
aus Bobeck

München 1976

Klinik für Innere Krankheiten der Tiere
Lehrstuhl für Krankheiten des Hausgeflügels, der
Zier- und Zoovögel des Fachbereiches Tiermedizin
der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Irmgard Gylstorff

Bestimmung der Serum- und Blutspiegel von 81.723 hfu bei
verschiedenen Vogelarten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde des
Fachbereiches Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von

Kuno-Alexander von Plocki

aus Bobeck

München 1976

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität Muenchen**

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. I. Gylstorff

Korreferent: Prof. Dr. D. O. Schmid

Tag der Promotion: 30. Juli 1976



Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Literatur	3
Eigene Untersuchungen	27
1. Versuchsanordnung	27
2. Material und Methodik	27
Ergebnisse	35
Diskussion	48
Zusammenfassung	53
Summary	55
Abbildungen	57
Literaturverzeichnis	78
Lebenslauf	95

EINLEITUNG:

Die Möglichkeiten einer erfolgreichen Therapie bakterieller Infektionen beim Geflügel werden durch das vermehrte Auftreten resistenter Bakterienstämme beeinträchtigt. Umso begrüßenswerter ist die Entwicklung neuer Arzneimittel, mit denen solche Keime erreicht werden können.

Neue Verbindungen werden bezüglich Wirkung, Pharmakodynamik, Pharmakokinetik etc. in der Regel an Labortieren getestet, seltener beim Vogel, wenngleich sie auch zum Einsatz in der Massengeflügelhaltung gedacht sind. Eine Prüfung für den generellen Einsatz in der tierärztlichen Vogelpraxis (Hunderte von taxonomisch stark unterschiedlichen Ordnungen, Familien, Genera und Spezies) findet nicht statt.

Nach heute allgemein anerkannten Grundsätzen (HEBOLD, 1972) ist aber die Übertragung der an einer Versuchstierart erarbeiteten Ergebnisse auf andere Arten nicht gestattet. Dies gilt ganz besonders für Vögel. Theoretisch muß für jede neue Tierart mindestens die Verträglichkeit und die Resorption bzw. die biologische Verfügbarkeit im Organismus untersucht sein, ehe eine neue Substanz bei dieser zum Einsatz kommen kann.

Eine neuere antibakteriell wirksame Substanz ist das Pleuromutilinderivat 81.723 hfu.

Da für Antibiotika der Blutspiegel als Anhaltspunkt für eine mögliche antibakterielle Wirksamkeit in vivo gilt, wurde mir die Aufgabe gestellt, für verschiedene Vogelarten Blutspiegelbestimmungen mit dem Wirkstoff 81.723 hfu (Hersteller: Sandoz AG, Basel) durchzuführen.

LITERATUR:

Eigenschaften von 81.723 hfu

KAVANAGH et al. beschreiben 1951, daß Kulturen des Basidomyzeten *Pleurotus mutilis* eine Substanz enthalten, die eine spezifische Hemmwirkung gegenüber Gram-positiven Bakterien besitzt. Diese Substanz wurde Pleuromutilin genannt.

Über die chemischen und physikalischen Eigenschaften von 81.723 hfu werden von EGGER und REINSHAGEN im Detail berichtet (EGGER, H. und H. REINSHAGEN, J. Antibiotics, in press).

81.723 hfu ist ein Pleuromutilinderivat mit der chemischen Bezeichnung 14- Desoxy-14-(2-diäthylaminoäthyl)-mercapto-acetoxy-mutilin Hydrogenfumarat. Es ist wasserlöslich und seine Lösung ist in neutralem und sauerem pH-Bereich stabil.

Biologische Eigenschaften:

81.723 hfu zeigt sich in vitro als besonders wirksam gegenüber Gram-positiven Bakterien wie Streptokokken, Staphylokokken sowie gegenüber Mykoplasmastämmen. Einige Shigella-, Klebsiella-, und Escherichia-coli-Stämme sind ebenfalls als noch empfindlich anzusehen. Andere Gram-negative Bakterien wie Proteusarten, Pseudomonas aeruginosa und Alcaligenes faecalis scheinen eine natürliche Resistenz gegenüber 81.723 hfu zu besitzen. 81.723 hfu wirkt in Dosen von 0.039 - 12.5 mcg/ml auf obengenannte Gram-positive Erreger bakteriostatisch. Bei Mikrokokkus

Oxford genügen sogar Dosen von 0.015 - 0.019 mcg/ml. Bakterizide Wirkungen konnten nur mit 100-fach höheren Konzentrationen beobachtet werden (DREWS et al., 1975).

Eine in vitro Resistenzentwicklung gegen 81.723 hfu erfolgt bei Mykoplasmen (*Mycoplasma gallisepticum*; *Mycoplasma hyorhinis*) langsamer (erst nach 10 Passagen) als gegen Tylosin (schon nach 3 - 5 Passagen) (DREWS et al., 1975). 81.723 hfu unempfindliche Mykoplasmasträmme sind auch Tylosin-resistent, während Tylosin-resistente Mykoplasmasträmme gegenüber 81.723 hfu empfindlich reagieren (DREWS et al., 1975). In unveröffentlichten Untersuchungen des Instituts (GERLACH) werden diese Angaben bestätigt. Außerdem stellen DREWS et al. (1975) bei einem *Klebsiella pneumonia*-Stamm (ATCC 10031) vollständige Kreuzresistenz zwischen dem Pleuromutilinderivat und Erythromycin, sowie Lincomycin fest. Eine partielle Kreuzresistenz desselben Keimes besteht auch gegen Chloramphenicol.

Toxizität: DREWS et al. (1975) stellen bei weiblichen Mäusen nach peroraler bzw. subkutaner Applikation eine LD₅₀ von 841 mg bzw. 521 mg/kg Körpergewicht (Kgw) fest. Bei 4 Wochen alten männlichen Hühnerküken betrugen die LD₅₀ - Werte nach peroraler bzw. intramuskulärer Applikation 1.860 mg bzw. 270 mg/kg Kgw. 3 Wochen alte männliche und weibliche Putenküken zeigen eine LD₅₀ von 1.345 mg/kg nach peroraler und von 409 mg/kg Körpergewicht nach intramuskulärer Applikation. Die LD₅₀-

Werte betrugen bei männlichen Tauben 812 mg/kg Kgw, bei weiblichen Tauben 917 mg/kg Kgw.

Das Verhalten von Arzneimitteln im Organismus. Die Höhe eines Blut- bzw. Gewebespiegels, zu einem gegebenen Zeitpunkt, ist die Resultante folgender pharmakokinetischer Teilaspekte im Organismus:

- a) Resorption (Anflutung)
- b) Verteilungskompartiment
- c) Bindung an Serumproteine, sowie Metabolisierungs- bzw. Biotransformationsvorgänge
- d) Elimination

Die biologischen Wirkungen lassen sich in lokale und resorptive unterscheiden, wobei im ersteren Fall der Applikationsort gleich dem Wirkungsort ist, während im zweiten Fall ein Resorptionsprozess dazwischen geschaltet ist (MØLLER, 1966). Unter Resorption eines chemischen Agens versteht SCHELER (1969) die Aufnahme desselben aus dem "Milieu extérieur" oder aus örtlich begrenzten Stellen des Körperinneren in die Lymph- und Blutbahn. Resorption spielt somit immer dann eine Rolle, wenn das Pharmakon nicht direkt in die Blutbahn injiziert wird. Sie kann auf Diffusionsvorgängen oder auf aktiven biologischen Vorgängen beruhen (KUSCHINSKY und LÜLLMANN, 1972). Die resorptionsdeterminierenden Faktoren sind neben Eigenschaften des biologischen Systems vor allem Löslichkeit, Lipophilie, Hydrophobie, Ionisierbarkeit, pK- bzw. pH-Wert-Abhängigkeit sowie die Molekülgröße. Diese Faktoren sind entscheidend für die Resorptionsge-

schwindigkeit und bestimmen durch komplexes Zusammenwirken mit den biologischen Gegebenheiten des Applikationsortes Art und Ausmaß der Stoffaufnahme (GEBHARDT, 1964; SCHELER, 1969).

Pharmaka können sich auf drei durch verschiedene Membransysteme getrennte Körperflüssigkeitsräume verteilen:

1. Auf das Blutplasma = intravasal
2. Auf das Blutplasma und die interzelluläre Flüssigkeit = intravasal und extrazellulär
3. Auf das Blutplasma, die interzelluläre und die intrazelluläre Flüssigkeit = im ganzen Körper

(KÜMMERLE, 1973; MUTSCHLER, 1973; SCHELER, 1969).

Von Seiten der Pharmaka sind hierfür maßgebend ihre molekulare Struktur und Größe, ihre Löslichkeitsverhältnisse, ihre Säure- Base-Natur, ihre Ladung und ihre chemischen Affinitäten (SCHELER, 1969).

Ein wesentlicher Faktor für die Verteilung mancher Pharmaka ist die Bindung an Plasmaproteine, besonders an Albumine (KLOTZ, 1957; RITSCHER, 1973).

Entsprechend der chemischen Struktur der Eiweiße können an der Eiweißbindung:

1. Ionenbindungen
2. Wasserstoffbrückenbindungen
3. Dipol-Dipol-Bindungen
4. Hydrophobe Wechselwirkungen

beteiligt sein. Diese verschiedenartigen Möglichkeiten der Eiweißbindung erklären auch, warum sehr unterschied-

liche Substanzen an Eiweiße gebunden werden können (MUTSCHLER, 1973). Der plasmaproteingebundene Anteil eines Pharmakons kann nicht diffundieren (BRUNNER und MACHEK, 1962; WALTER und HEILMEYER, 1969; ADAM, 1970; MUTSCHLER, 1973) und unterliegt auch nicht der Bio-transformation und der Ausscheidung.

Der gebundene Anteil stellt eine inaktive Speicherform dar, aus der bei einer Konzentrationserniedrigung der freien Form, zur Wiederherstellung des Gleichgewichtes im Kreislauf, Pharmakonmoleküle freigesetzt werden. Zwischen der Bindungskonstanten K eines Pharmakons, der molaren Proteinkonzentration C_p und dem Verteilungskoeffizienten P des Pharmakons besteht nach FRIMMER (1969) die Beziehung:

$$\log \frac{K}{C_p} = \log K_p + 0,9 \log P$$

Zahlreiche Proteine des Blutplasmas üben Transportfunktionen aus (BENNOLD, 1938; SCHANKER, 1964). FRIMMER (1969) unterscheidet monovalente Transportvehikel (z.B. das eisenbindende Globulin "TRANSFERRIN"), die nur ein Produkt transportieren und polyvalente Vehikel wie das Albumin, das z.B. sowohl Hormone als auch Arzneistoffe oder Vitamine transportiert. Wie bereits erwähnt, werden nicht selten Pharmaka an Albumine gebunden. Neben den Albuminen können bei elektrophoretischen Untersuchungen des Bluteiweißes auch Globulinfaktionen z.B.:

α_1 und α_2 , β_1 und β_2 , sowie γ festgestellt werden. Die verschiedenen Fraktionen, die auch als Spurenproteine bezeichnet werden, treten in sehr geringen Konzentrationen von nur etwa 1/100 bis 1/1000 des Albumins auf (RITSCHEL, 1973) und können ebenfalls Pharmaka binden.

Zur Bestimmung des Ausmaßes der Proteinbindung eines Arzneistoffes werden Verfahren wie die Gleichgewichtsdialyse, Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Elektrophorese

herangezogen. (MEIENHOFER und ZAHN, 1960; GRABAR und BURTIN, 1960; SCHULTZE und HEIDE, 1960; HITZIG, 1961 und 1963; WUHRMANN und MÄRKI, 1963).

Nach unveröffentlichten Angaben der Herstellerfirma wird 81.723 hfu weitgehend an Plasmaproteine gebunden: Es ist bisher allerdings noch nicht bekannt an welche. Aufgrund dieser Tatsache muß damit gerechnet werden, daß bei der Bestimmung von Serum- bzw. Plasmaspiegeln keine identischen Standardkurven zu erwarten sind, und daß stärkere artspezifische Unterschiede auftreten können.

Im Gegensatz zur chemischen Umwandlung körpereigener Stoffe (Metabolismus) benutzt FRIMMER (1969) für die Veränderung körperfremder Verbindungen den Begriff Biotransformation. Eine Biotransformation kann, muß aber nicht zu einer Inaktivierung (= Entgiftung nach GADDUM, 1952) von Wirkstoffen führen. Andererseits können inaktive Substanzen durch Biotransformation in eine pharmakologisch wirksame Form übergeführt werden (= Giftung nach FRIMMER, 1969).

Bei der Biotransformation spielen neben spaltenden Vorgängen auch Reaktionen eine Rolle, bei denen das ursprüngliche Molekül vergrößert wird. Die meisten der bisher bekannten Reaktionen der Biotransformationen werden durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums (Mikrosomen) katalysiert. Andere Reaktionen werden durch gelöste Enzyme des Zytoplasmas oder der Gewebsflüssigkeiten verursacht. Einige der wichtigsten Reaktionstypen für die Biotransformation von Arzneimitteln und Fremdstoffen sind:

Hydrolyse,

Hydroxylierung aromatischer Ringe,

Deaminierung,
N-Dealkylierung,
Dehalogenierung,
Desulfierung und
Acetylierung.

(MERZ, 1965; FRIMMER, 1969; SCHELER, 1969).

Die Ergebnisse solcher Biotransformationen sind unter anderem:

- a) verbesserte Löslichkeit
- b) leichtere Ausscheidung über Niere und Galle
- c) besserer Ausgangspunkt für weitere Umbauvorgänge

Der Abstrom des Pharmakons aus dem Gefäßsystem durch Verteilung in die jeweiligen Kompartimente, die Plasmabindung und die Ab- bzw. Umbauvorgänge senken schon während der Anflutung die Blutkonzentration. Gleichzeitig setzt aber auch die Elimination ein.

Elimination ist die Summe aller Vorgänge, die zu einer Konzentrationsabnahme eines Pharmakons im Körper führt. Sie umfaßt die Abgabe des Stoffes in das Milieu extérieur (Ausscheidung, Exkretion) sowohl in unveränderter wie auch in durch chemische Reaktion veränderter Form (Biotransformation) (EICHHOLZ, 1957; SCHELER, 1969).

Die Eliminationsgeschwindigkeit ist wie die Resorptionsgeschwindigkeit von einer Reihe organspezifischer und wirkstoffspezifischer Faktoren abhängig.

Für Chemotherapeutika dient das Verschwinden bzw. die Abnahme einer antibakteriellen Wirksamkeit im Blut häufig als "Meßgröße" für die Elimination. Dabei werden auch antibakteriell wirksame Metaboliten erfaßt, deren Eliminationskonstante von der Ausgangssubstanz unterschiedlich ist. Das Ergebnis sind Eliminationskurven, die nicht mehr einer e-Funktion entsprechen.

Nach rascher i. v. Injektion wird der Blutspiegel nur von der Eliminationsgeschwindigkeit bestimmt.

$$y = a \times e^{-k_2 t}$$

Die Blutkonzentration eines i. v. injizierten Pharmakons, bezogen auf die Zeit, folgt also meist einer e-Funktion.

Ob diese e-Funktion im unteren Kurvenanteil noch exakt erfüllt wird, hängt von der Art der Elimination ab.

Würde die Elimination aus dem Blut nur durch Abstrom in das Gewebe, nicht aber durch Ausscheidung oder Biotransformation erfolgen, so stellte sich nach Auffüllen des Gewebekompartimentes ein Gleichgewicht ein.

Die Konzentrationskurve würde zunächst einer e-Funktion folgen, dann aber einen konstanten Wert einnehmen (FRIMMER, 1969).

Eliminationswege: Verdauungstrakt
 Leber - Galle
 Niere

Lunge - Atem

Haut

Die Kinetik der Verteilungsprozesse und der schließlich erreichten Konzentrationen im Verteilungskompartiment ist nach KUSCHINSKY und LÜLLMANN (1972) abhängig von den organspezifischen Affinitäten (Speicherorgane), dem Verhältnis von Resorptions- zur Eliminationsgeschwindigkeit und den Metabolisierungsvorgängen. Die Konzentration eines Heilmittels im Organismus ist nur dann konstant, wenn über längere Zeit die kontinuierliche Resorption die ständige Elimination gerade ausgleicht. Da die Zufuhr des Pharmakons, mit Ausnahme der Depotpräparate, in der Regel diskontinuierlich erfolgt, wird dieser Gleichgewichtszustand meist nicht erreicht und es besteht somit ein undulierender Blut- bzw. Gewebespiegel. Dieser kann aber hingenommen werden, wenn die Pharmakonkonzentration im Minimum nicht unter dem therapeutischen Schwellenwert liegt, bzw. das Maximum die toxische Grenze nicht erreicht.

Das Verteilungsgleichgewicht von Pharmaka zwischen Blut und Gewebe kann durch Bindung an Bestandteile des Blutes oder des Gewebes beeinflusst werden. Ist die Bindung im Gewebe besonders intensiv, spricht man von einer Speicherung (FRIMMER, 1969).

Bestimmung von Antibiotikakonzentrationen

Antibiotikakonzentrationsbestimmungen in vitro werden neben der quantitativen chemischen Analyse und dem Nachweis radiomarkierter Moleküle mikrobiologisch durchgeführt. Die gebräuchlichsten Methoden sind:

1. Reihenverdünnungstest
2. Trübungsmeßverfahren
3. Agardiffusionstest

Die Literatur über Reihenverdünnungsverfahren ist enorm. JAKSCH, 1954 und 1959; FEIERSINGER, 1955; KLEIKAMP, 1955 verwendeten Reihenverdünnungsverfahren bei ihren Arbeiten. Eine Übersicht über die wichtigsten Faktoren findet sich bei ERICSSON, (1964, 1967, 1971). Im Reihenverdünnungsverfahren werden Blutplasma- bzw. Blutserum oder Organsuspensionen meist in Form einer logarithmischen Reihe (2,4,8,16,...) mit einem Nährmedium verdünnt, dem ein für das betreffende Antibiotikum voll empfindlicher Keim zugesetzt wird. Die Röhrchen werden 18 Stunden bebrütet und das Wachstum mit einer Standardreihe verglichen, bei der unter sonst gleichen Bedingungen bekannte Antibiotikamengen (log. Verdünnungsreihe) zugesetzt wurden. Eine Modifizierung dieses Reihenverdünnungstestes ist die photometrische Trübungsmessung. GROVE, 1955; KLEIN, 1957; OBERZILL, 1967; WALLHÄUSER, 1967 und HEIN, 1970 arbeiten mit dieser Methode.

Im Agardiffusionstest tritt nun anstelle der Konzentrationsabstufung der Röhrchenreihe ein durch die Agardiffusion geschaffenes, kontinuierliches Konzentrationsgefälle. Unter dessen Einwirkung wird die Keimeinsaat auf der Testplatte regional gehemmt. PSCHYREMBEL, (1969) unterscheidet Reihenverdünnungsverfahren und Agardiffusionstest folgendermaßen: "Bei den Verdünnungstesten wird diejenige kleinste Antibiotikakonzentration (ERICSSON, 1964; ADAM und MARGRET, 1971 verwenden den Begriff MHK = minimale Hemmkonzentration) einer Verdünnungsreihe ermittelt, die gerade noch eine vollständige Wachstumshemmung des Testkeims nach einer bestimmten Bebrütungszeit zeigt. Bei den Diffusionstesten wird diejenige Antibiotikamenge bestimmt, die nach Hineindiffundieren in ein festes Kulturmedium die aufgeimpften Testkeime nach einer bestimmten Bebrütungszeit in einem bestimmten Umkreis hemmt."

Nach OBERZILL (1962) wird auch hier die hemmende Grenzkonzentration nicht als Absolutwert bestimmt, sondern der für eine zu untersuchende Probe abgelesene Wert zu den Werten bekannter Standardkonzentrationen in Beziehung gesetzt.

Als gebräuchlichste Ausführungsformen kommen in Betracht:

1. der Lochtest
2. der Zylindertest
3. der Papierblättchentest

1. Beim Lochtest dienen zur Aufnahme der Hemmstofflösungen, mit einem sterilen Korkbohrer kreisrund ausgestanzte Löcher. KLEIN (1957) gibt Durchmesser von 8 - 12 mm an, WALLHÄUSER und SCHMIDT (1967) bevorzugen einen solchen von 10 mm.

OBERZILL (1967) empfiehlt, bei üblichen Agarplatten von 90 mm Durchmesser höchstens 4 Löcher pro Platte auszustanzen, damit sich die Hemmzonen nicht gegenseitig beeinflussen oder zu nahe an den Schalenrand heranreichen. Das Ausstechen der Löcher muß mit Sorgfalt geschehen, um gleichmäßige Hemmzonenränder und kreisrunde Hemmzonen zu gewährleisten. Schräges Ausstechen der Löcher und Abheben der Agarschicht vom Schalenboden stellen Fehlerquellen dar, die zu falschen oder ungenauen, nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.

2. Im Zylindertest werden anstelle der ausgestanzten Löcher Zylinder verwendet, die, auf die erstarrte Agarschicht aufgesetzt, zur Aufnahme der Proben und Standardlösungen dienen. Die Zylinder können aus Porzellan, Glas, Aluminium oder aus rostfreiem Stahl gefertigt sein. Beschädigte Zylinder oder ungleich fest auf den Agar aufgesetzte Zylinder verfälschen die Diffusionswerte bzw. Hemmzonen.

3. Große Bedeutung kommt dem Papierblättchentest zu, der auf der Verwendung von Filterpapierscheiben zur Aufnahme der Standard- und Probenlösungen beruht. Bei der Blättchendiffusionsmethode kann auch mit Vollblut gearbeitet

werden (WACHENDÖRFER, 1970). Dies ist, vor allem bei Vogelarten, bei denen nur kleine Blutmengen zu gewinnen sind, ein Vorteil gegenüber der Trübungsmessung.

Beim Papierblättchentest ist nicht eine bestimmte Konzentration einer Lösung für die Hemmhofgröße maßgebend, sondern die Menge der aufgetragenen Substanz.

WALLHÄUSER (1967) weist besonders daraufhin, daß stets darauf zu achten sei, daß sich bei Auflegung der Papierblättchen, wobei jeweils 3 mit Arbeitsstandard und 3 mit der zu prüfenden Lösung beschickt sind, keine "Luftpolster" bilden, da sonst die Diffusion beeinflußt wird. Besonders ausgedehnte Anwendung findet die Papierblättchenmethode bei Empfindlichkeitsprüfungen von Keimen gegenüber verschiedenen, therapeutisch verwendeten Antibiotika (OBERZILL, 1967; WACHENDÖRFER, 1970).

Einflüsse auf die Hemmhofgröße:

1. Nährmedium
2. Agardicke
3. Einsaatdichte der Keime
4. Vordiffusion, Vorbebrütung und Diffusionskoeffizient
5. Temperatur und Bebrütungszeit
6. pH-Wert.

Die Nährmedien müssen ein gutes Keimwachstum gewährleisten.

Nach GERLACH (1967) hat sich der Bakto- Mueller- Hinton-Agar gut bewährt. ERICSSON (1971) und TEICHMANN (1976) verwenden für ihre Untersuchungen ebenfalls Bakto-Mueller- Hinton-Agar und machen recht gute Erfahrungen damit.

Die Agarschichtdicke beeinflusst die Hemmhofgröße nicht merklich (GERLACH, 1967). Nach ERICSSON (1964) unterscheidet sich die Hemmzonengröße selbst bei dreidimensionaler Diffusion kaum von der einer zweidimensionalen.

Die Einsaatdichte der jeweiligen Bakterienkultur hat einen großen Einfluß auf die Hemmhofgröße. Ideal ist eine Koloniedichte, bei der gerade noch keine Konfluktation auftritt. Bei höherer Keimzahl muß damit gerechnet werden, daß die Antibiotika-Moleküle die Oberfläche der Bakterien nicht mehr ausreichend besetzen. Dadurch können sich die Keime ungehemmt vermehren, obwohl die Antibiotika-Konzentration an sich noch wirksam wäre (ERICSSON, 1964; MEYNELL und MEYNELL, 1970).

Bei langsam wachsenden Keimen spielt die Einsaatmenge auch insofern eine Rolle, da es mit der Zeit zu einer Anreicherung von unerwünschten Stoffwechselprodukten und zusätzlich bei Flüssigkeitsmedien zur Verdunstung kommt (SMITH, 1971; RODWELL, 1969).

Versuche, durch Vordiffusion einen Ausgleich für unterschiedliche Antibiotika zu schaffen, sind umstritten. Nach PETERSDORF und FLORDE (1963) hat die Vordiffusion keinen Einfluß auf die endgültige Hemmhofgröße. Nach ERICSSON (1964) kann der Konzentrationsgradient der Antibiotika im Agar durch Vordiffusion stabilisiert werden, das Antibiotikum kann eine bestimmte Zeit diffundieren, bevor der Keim wächst.

Zur Erzielung größerer Hemmhöfe empfiehlt WALLHÄUSER (1967), die fertigen Platten zunächst 1 - 4 Stunden bei 4 ° C im Kühlschrank vordiffundieren zu lassen. Beginnt die Bebrütung der Testplatten gleichzeitig mit dem Einsetzen der Agardiffusion, so sind Diffusionszeit und Bebrütungszeit gleich. Experimentell läßt sich jedoch die Diffusionszeit unabhängig von der Bebrütungszeit verändern, indem entweder durch Vordiffusion die Diffusionszeit verlängert oder durch Vorbebrütung die, bis zum Erreichen einer bestimmten Wachstumsdichte zur Verfügung stehende Diffusionszeit verkürzt wird. Die sichtbare Hemmgrenze entsteht nun dort, wo sich eine bestimmte über der hemmenden Grenzkonzentration liegende "kritische Konzentration" des Antibiotikums zu einem Zeitpunkt befindet, zu welchem eine bestimmte, über der Einsaatdichte liegende, "kritische Keimdichte" von der wachsenden Testkeimpopulation erreicht und überschritten wird (OBERZILL, 1967).

Bezeichnet man nun die erforderliche Bebrütungszeit, welche die Keimeinsaat benötigt, um die bestimmte kritische

Keimdichte zu erreichen, als "kritische Zeitdauer"
 t_o , so ist bei gleichzeitigem Beginn von Diffusion und
Bebrütung die zur Verfügung stehende Diffusionszeit eben
dieses t_o , während bei einer bestimmten Vordiffusionszeit
 t_d , die für die Hemmzonengröße maßgebende Diffusionszeit
sich auf

$$t = t_o + t_d$$

verlängert. Umgekehrt verkürzt sich die Diffusionszeit
bei einer Bebrütungszeit t_b auf

$$t = t_o - t_b$$

Als wesentliche Voraussetzung der quantitativen Bestimmung des Antibiotikumsgehaltes einer unbekannten Probe im Vergleich zu bekannten Standardkonzentrationen wird die qualitative Identität von Probe und Standard angesehen (OBERZILL, 1967).

Sollen zwei Substanzen identisch sein und vergleichbare Effekte im Agar-Diffusions-Test liefern, so muß vorausgesetzt sein, daß sie unter sonst gleichbleibenden Testbedingungen auch identische Diffusionskoeffizienten haben. Da diese wiederum aber die Steilheit der Bezugskurve zwischen Konzentrationen und Diffusionsstrecken maßgeblich beeinflussen, ergibt die Parallelität der Standardkurven die Beurteilungsgrundlage, ob eine solche Identität der zu untersuchenden Probe mit der verwendeten Standardsubstanz angenommen werden kann (OBERZILL, 1967).

Die Temperatur bei der die Beimpfung des verflüssigten Agarmediums erfolgt, stellt eine weitere Beeinflussungsmöglichkeit für die Hemmhofgröße dar. Erhöhte Temperatur kann sich wie eine Vorbebrütung auswirken oder aber eine Verminderung der wachstumsfähigen Keimeinsaat bedeuten. Die Bebrütungszeit der beschickten Agarplatten stellt einen wichtigen Faktor dar (ERICSSON, 1971). Sie soll 16 - 20 Stunden nicht überschreiten (abhängig von der Keimart), da sonst die Bakterien in die Hemmhöfe einwachsen können. Die meisten Antibiotika besitzen ein pH-Wert abhängiges Wirkungsoptimum. So besitzen z. B. Tetracycline ein Wirkungsoptimum im pH-Bereich von 6.1 - 6.6. (WALTER und

HEILMEYER, 1969). Für 81.723 hfu liegt das Wirkungsoptimum im alkalischen Bereich (pH-Wert 7.3 - 8.0, DREWS et al., 1975).

Die Techniken der Blutentnahme bei Vögeln zu Untersuchungszwecken wird in der Literatur unterschiedlich beschrieben HIRSCHBÜCHLER (1955); AICHINGER (1957) und JAKSCH (1959) halten die Blutentnahme aus dem Hühnerkamm für eine geeignete Methode. Ein Nachteil dabei ist, besonders bei kaltem Wetter, die starke Nachblutungsneigung.

WEHNER (1930) empfiehlt beim Huhn das Anstechen der Vena cutanea ulnaris mit einem Skalpell knapp oberhalb des Ellenbogengelenkes. FEIERSINGER (1970) weist daraufhin, daß bei der Blutentnahme aus der Vena cutanea ulnaris häufig Hämatome entstehen. SCHERMER (1958), SCHELLNER (1970) und KLEIN (1974) entnehmen bei Huhn und Taube Blut aus der Vena cutanea ulnaris mit einer Spritze und aufgesetzter Kanüle. Bei Großpapageien und Großsittichen bis zur Größe des Nymphensittich wird diese Methode am Lehrstuhl für Krankheiten des Hausgeflügels der Zier- und Zoovögel des Fachbereiches Tiermedizin der Universität München ebenfalls angewandt. VOGEL (1970) sticht zur Gewinnung von Blut aus der Vena cutanea ulnaris bei Tauben das Gefäß mit einer Federlanzette an. Bei kleineren Tieren, etwa Wellensittichgröße, wird zur Blutentnahme mit Spritze und Kanüle die Vena jugularis benutzt (PETRAK, 1969; WACHENDÖRFER, 1970). BECHINGER (1914) und HENSLER (1961) wenden bei Ihren Untersuchungen die Herzpunktion an. Die Institutserfahrungen mit dieser Methode sind jedoch nicht sehr ermutigend, (Schocktod).

Die i. m. Injektionen von Arzneimitteln werden mit einer längeren, dünnen Kanüle, kraniodorsal gerichtet, unmittelbar parallel zur Crista sterni am Übergang des mittleren in das kraniale Drittel durchgeführt (POHLMAYER und WISSDORF, 1976).

Eigene Untersuchungen:

1. Versuchsanordnung:

- a) Aufstellung der Eichkurven mit Hühner-, Gänse-, Enten-, Puten-, Tauben-, Nymphensittich-, Amazonen-, Bussard-, Pferde-, Hammel-, Kälberserum.*
- b) Aufstellung der Eichkurven mit Hühnerblut und Taubenblut.
- c) Aufstellung der Eichkurve mit Rinderalbumin
- d) Aufstellung einer Eichkurve mit Pufferlösung
- e) Vergleich der Eichkurven untereinander (Statist. Auswertung und bei Kurven mit identischer Steigung, Errechnung mathematischer Beziehungen).
- f) Messung der Blutspiegel nach i. m. - Applikation von 81.723 hfu** bei Taube, Nymphensittich und Amazone nach verschiedenen Zeitintervallen.

2. Material und Methodik:

Die Vogelseren für die Aufstellung der verschiedenen Eichkurven wurden vom Institut zur Verfügung gestellt. Sie stammten großteils aus institutseigenen Tierbe-

ständen und von Patienten. Die Seren der Säugetiere wurden im einschlägigen Handel bezogen.

* 81.723 hfu stand in Reinsubstanz als kristalliner, weißer Feststoff zur Verfügung.

** Für die Verabreichung an die Vögel wurde eine 12,5% Lösung von 81.723 hfu benutzt (als **Versuchscharge** mit der Nummer 265 M 4 der Sandoz AG, Basel zur Verfügung gestellt).

Aus Tabelle I sind die Einzelheiten der Versuchsanordnung zu ersehen.

Tierart	Blutentnahme nach Stunden									
	Tierzahl									
Taube	1/2	1	2	4	6	8	10	12	24	48
50 mg/kg Kgw.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Nymphensittich	-	1	-	4	-	8	-	-	-	-
50 mg/kg Kgw.	-	5	-	5	-	5	-	-	-	-
Amazone	-	1	-	4	-	8	-	-	-	-
50 mg/kg Kgw.	-	3	-	3	-	3	-	-	-	-

Herstellung der Keimsuspension und des Agarmediums:

Auf Grund der Vorarbeiten der Herstellerfirma von 81.723 hfu wurde der Agarlochtest gewählt. Die Methodik erfolgte nach Vorschlag der Herstellerfirma. Der als Testkeim dienende Micrococcus Oxford wurde auf Schrägagarröhrchen (Difco-Nutrient-Agar) vermehrt und bei 4 ° C gelagert. Vor der Verwendung wurde die Kultur auf Reinheit geprüft. Eine Keimsuspension wurde aus mehreren Kolonien mit

10 ml Difco-Heart-Infusion-Broth hergestellt und anschließend titriert. Die Ausgangssuspension erwies sich ohne Titerabfall über mehrere Tage im Kühlschrank lagerfähig.

Vor Gebrauch wurde die Suspension auf 10^9 Keime/ml eingestellt. Als Agarmedium wurden 38 g Difco-Mueller-Hinton-Agar in 1000 ml Aqua dest. nach Autoklavieren verwendet. In das im Wasserbad auf 45°C abgekühlte Medium wurden 8 ml obiger Keimsuspension zugefügt und nach sorgfältiger Durchmischung in Plastikpetrischalen ($\varnothing$ 90 mm) gegossen (15 ml/Platte). Die Platten wurden vor der Weiterverwendung mindestens 1 Stunde bei 4°C gelagert. Pro Platte wurden 3 Löcher (gleicher Abstand voneinander) mit einem sterilen Korkbohrer ausgestanzt.

Herstellung der Arbeitsverdünnungen und Auswertung:

12 mg 81.723 hfu (es wurde ein von der Herstellerfirma zur Verfügung gestelltes Standardpräparat verwendet) wurden in 10 ml Aqua dest. gelöst. Zu 1 ml dieser Lösung wurden 9 ml eines Puffers (pH 8,0 gegeben, der aus einer 0,05 m $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ - Lösung (22,3 g auf 1000 ml) bestand. (Dieser Puffer wird nachfolgend als Phosphatpuffer I bezeichnet) 0,1 ml dieser 81.723 hfu-Verdünnung (nachfolgend als Stammlösung bezeichnet) wurden mit 5,9 ml artspezifischem Serum vermischt. Diese als Arbeitsstandard bezeichnete Verdünnung enthält 2 mcg 81.723 hfu/ml.

Folgende Verdünnungsreihe wurde angelegt:

Tab. II

Arbeitsver- dünnungsst.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ml Serum	0,4	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10	0,05	0,00
ml Arb.-Stand.	0,1	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50
mcg 81.723 pro 0,1 ml	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20

Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 0,1 ml in je 3 der ausgestanzten Löcher auf den Agarplatten pipettiert. Nach 2-stündiger Vordiffusion der Platten bei 4 ° C wurden diese Platten 18 Stunden bei 37 ° C bebrütet und anschließend ausgewertet. Die entstandenen Hemmhöfe wurden mit einer Schublehre gemessen, die Mittelwerte und deren Standardabweichungen errechnet.

Mit demselben Rechenprogramm (Diehl-Tischrechner, Programm-Nr. 10 371) wurde außerdem festgestellt, ob sich die benachbarten Meßpunkte der Standardkurve signifikant unterschieden (t-Test nach STUDENT). Aus den gemessenen Hemmhofdurchmessern und zugehörigen Konzentrationen wurde eine Kurve konstruiert und die Standardabweichungen der Durchschnittswerte angedeutet. Alle Standardkurven wurden mehrfach unabhängig angesetzt, um die Reproduzierbarkeit der Technik zu überprüfen und um genauere Mittelwerte und Standardabweichungen zu erhalten. Wird anstelle von Serum mit Vollblut gearbeitet, so muß dieses nach Blutentnahme zunächst ungerinnbar gemacht werden. Dazu wird ein Puffer in Anlehnung an WACHENDÖRFER (1970) hergestellt (im folgenden als Phosphatpuffer II bezeichnet). Zu 1000 ml einer ca. 0,1 m Mononatriumphosphatlösung wurden 1 g Ammoniumoxalat - $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O}$ - als Antikoagulans hinzugegeben und mit 1 n NaOH auf pH 4,5 eingestellt. Die Lösung wurde 30 Min. bei 100 ° C im Dampftopf erhitzt und anschließend bei 4 ° C aufbewahrt. Zu 1 ml Vollblut wurden 2 ml Phosphatpuffer II gegeben und das Gemisch bei -20 ° C bis zur Verwendung eingefroren. Das Blut - Phosphatpuffer II - Gemisch wurde nach dem Auftauen (zuerst im Kühlschrank, danach bei Zimmertemperatur) anstelle der artspezifischen Seren mit 81.723 hfu-Stammlösung vermischt und dann die zuvor beschriebene Verdünnungsreihe hergestellt.

Das Verfahren zur Verwendung von Rinderalbumin anstelle artspezifischer Seren wurde von WACHENDÖRFER (1970) übernommen. 1 g Rinderalbumin wurden in 26 ml eines Puffers ge-

löst, der aus einer 0,1 m Dinatriumphosphatlösung (pH 7,4) bestand und 30 Min. im Dampftopf bei 100 ° C erhitzt worden war.

Die Rinderalbumin-Pufferlösung wurde wiederum auf pH 7,4 eingestellt. Zur Lagerung wurde das Gemisch bei -20 ° C eingefroren. Das Puffer-Albumingemisch wurde vor der Verwendung zu gleichen Teilen mit Phosphatpuffer II vermengt. Diese Mischung wurde anstelle der artspezifischen Seren zur Verdünnung der Stammlösung verwendet und aus dem resultierenden Arbeitsstandard die Verdünnungsreihe hergestellt. Die Eichkurven mit Vollblut und mit Rinderalbumin wurden wie die der Seren berechnet und graphisch dargestellt.

Um die erhaltenen Standardkurven miteinander zu vergleichen oder bei Parallelkurven, mit Hilfe eines additiven bzw. subtraktiven Faktors von einer Kurve auf andere schließen zu können, wurden folgende Berechnungen vorgenommen:

Die Formel für eine allgemeine Gerade kann als $y = a_1 x + a_0$ ausgedrückt werden. Dabei bedeutet a_1 Steigung der Kurve, a_0 = Schnittpunkt mit der y-Achse.

Es wurde die lineare Regression von y auf x ermittelt, sowie der Korrelationskoeffizient (r^2) zwischen x und y. Gerechnet wurde mit einem Hewlett-Packard 65 (Stat. Pac. 1).

Die mathematische Grundlage ist zitiert bei ARMITAGE (1971).

Die Berechnung eines additiven bzw. subtraktiven Faktors für die absolut geraden Kurvenanteile erfolgte für identische Kurven von Gans und Pute sowie für Kalb mit Pferd als "Referenztier" (alle Kurven besitzen dieselbe Steigung).

Bei einer zweiten Gruppe von Kurven gleicher Steigung wurden die entsprechenden Faktoren für Taube und Ente, Bussard und Nymphensittich bezogen auf das "Referenztier" Schaf berechnet. Der subtraktive Faktor von Hühnerblut auf Hühnerserum bzw. Taubenblut auf Taubenserum konnte wegen der Parallelität der Kurven ebenfalls bestimmt werden.

Ergebnisse:

Die Methodik zur Erstellung der Standardkurven ergab sehr gut reproduzierbare Ergebnisse. Für jedes Serum wurde die Standardkurve mehrfach angesetzt. Die Standardabweichungen der einzelnen Meßpunkte lagen zwischen 0,028 und 0,010. Die Standardabweichungen benachbarter Meßpunkte führten in keinem einzelnen Fall zu Überschneidungen (sehr hohe Signifikanz).

Die Korrelation zwischen der Hemmhofgröße und der Wirkstoffkonzentration wurde errechnet und ergab immer Werte, die über 0,96 lagen.

Die Aufstellung der Eichkurven mit den verschiedenen Seren ergab stark von einander abweichende Kurven, die in ihrem Mittelteil als Gerade anzusehen waren. Am oberen und/oder unteren Ende traten erwartungsgemäß Abweichungen von der Geraden auf.

Mit Pufferlösung anstelle der Seren ließen sich im vorgegebenen Konzentrationsbereich keine Eichkurven aufstellen, da die riesigen Hemmhöfe sich überschnitten. Die Pufferlösung erwies sich demnach als nicht vergleichbares Diffusionsdepot. Ähnliche Verhältnisse, wenn auch nicht ganz so drastisch, lagen bei der Verwendung von Rinderalbumin vor (Abb. 12).

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse mit Serum erzielt:

Hühnerserum (Abb. 1) Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationsstufen 0,8 und 1,6 mcg/ml.

Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 5,917 x + 1,799$$

Gänseserum (Abb. 2):

Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,8 und 1,6 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 5,57 x + 1,72$$

Entenserum (Abb. 3):

Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,8 und 1,6 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 6,242 x + 1,582$$

Bei der Durchführung der Methodik fiel auf, daß nach Zusetzen der Stammlösung zu Enten-, Tauben-, Bussard- und Nymphensittichserum nach ca. 1 - 3 Std. (abhängig von der Temperatur) ein Niederschlag auftrat. Das Gemisch wurde nach sorgfältigem Aufschütteln wie üblich sofort verwendet. Die Reproduzierbarkeit wurde nicht beeinträchtigt. Zur Absicherung der Ergebnisse, vor allem im Hinblick darauf, daß bei Ente und Taube im geraden Teil identische

Standardkurven auftraten (beide Seren zeigten diese Niederschläge), wurde versucht festzustellen, ob das 81.723 hfu selbst an den Vorgängen direkt mitbeteiligt war. Zunächst wurde festgestellt, daß der in der Stammlösung enthaltene Phosphatpuffer I alleine, d.h. ohne Zusatz von 81.723 hfu den Niederschlag in den Seren verursachte. In stammlösungshaltigen Seren wurde der Niederschlag hochtourig (19000 U/min) abzentrifugiert und sowohl der Überstand als auch der Niederschlag auf 81.723 hfu-Gehalt untersucht. 81.723 hfu war fast vollständig im Überstand enthalten, im Niederschlag ließen sich lediglich Spuren nachweisen.

Putenserum (Abb. 4): Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,8 und 1,6 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 5,925 x + 1,56$$

Taubenserum (Abb. 5): Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,8 und 1,6 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 5,433 x + 1,71$$

Taubenblut (Abb. 5 a):

Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,8 und 1,6 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 5,61 x + 1,736$$

Nymphensittichserum (Abb. 6):

Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,6 und 1,6 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 5,3 x + 1,774$$

Amazonenserum (Abb. 7):

Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,6 und 1,4 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 6,217 x + 1,713$$

Bussardserum (Abb. 8): Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,8 und 1,6 mcg/ml. Die beiden ersten Konzentrationspunkte weisen keine meßbaren Hemmhöfe auf, bei ihnen erfolgt das Keimwachstum bis an den Rand des ausgestanzten Agarloches. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 5,036 x + 1,246$$

Pferdeserum (Abb. 9): Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,8 und 1,6 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 5,475 x + 1,721$$

Schafserum (Abb. 10): Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,6 und 1,4 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 5,6 x + 1,827$$

Kälberserum (Abb. 11): Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationspunkten 0,8 und 1,6 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 4,975 x + 1,711$$

Rinderalbumin (Abb. 12): Der gesamte Kurvenverlauf ist linear. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 3 x + 2,24$$

Die graphische Darstellung der verschiedenen Standardkurven zeigte, daß die Eichkurven in ihrem geraden Teil teilweise parallel verliefen. Sie unterschieden sich lediglich bezüglich des Schnittpunktes mit der y-Achse. Eine Durchsicht ergab, daß sich 2 Gruppen unterscheiden ließen. Die Gruppe 1 (Abb. 14) wird gebildet von den Seren von Gans, Pferd, Kalb und Pute, die Gruppe 2 (Abb. 15) von den Seren Schaf, Taube, Ente Bussard und Nymphensittich.

Um die parallelen Kurven miteinander vergleichen zu können, wurden die von der Geraden abweichenden Meßpunkte weglassen (die in den vorne angegebenen Formeln der Kurven einbezogen worden waren) und für den geraden Anteil der

Kurve eine neue Formel berechnet.

$$\text{Gans:} \quad y = 5,5 x + 1,74$$

$$\text{Pferd:} \quad y = 5,5 x + 1,72$$

$$\text{Kalb:} \quad y = 5,5 x + 1,66$$

$$\text{Pute:} \quad y = 5,5 x + 1,64$$

Die Differenz zwischen den einzelnen Kurven ist also ein kleiner additiver bzw. subtraktiver Faktor. Bezogen auf das Pferd ergeben sich z.B.

$$\text{Gans:} \quad + 0,02$$

$$\text{Pute:} \quad - 0,08$$

$$\text{Kalb:} \quad - 0,06$$

Das bedeutet, man könnte eine Eichkurve mit Pferdeserum aufstellen (Serum in größerer Menge leicht gewinnbar) und diese für die drei anderen Tierarten als Standardkurve benutzen, indem man das jeweilige Ergebnis mit obigen Faktoren korrigiert.

Für die Gruppe 2 (siehe Abb. 15) wurde entsprechend vorgegangen. Die Gleichungen der Kurven wurden wie folgt berechnet:

$$\text{Schaf:} \quad y = 6,0 x + 1,82$$

$$\text{Ente:} \quad y = 6,0 x + 1,66$$

$$\text{Taube:} \quad y = 6,0 x + 1,66$$

$$\text{Bussard:} \quad y = 6,0 x + 1,14$$

$$\text{Nymphens.:} \quad y = 6,0 x + 1,72$$

Wenn man eine Standardkurve mit Schafserum aufstellt, so ergeben sich folgende Korrekturfaktoren:

$$\text{Taube:} \quad - 0,16$$

$$\text{Ente:} \quad - 0,16$$

$$\text{Bussard:} \quad - 0,68$$

$$\text{Nymphens.:} \quad - 0,10$$

Für das Amazonen- und Hühnerserum fanden sich keine parallelen Standardkurven anderer Tierarten, so daß keine Vergleichsberechnungen möglich sind.

Hühnerblut (Abb. 13): Der gerade Teil der Standardkurve liegt zwischen den Konzentrationsstufen 0,8 und 1,6 mcg/ml. Die Formel der Kurve lautet:

$$y = 5,2 x + 2,1$$

Der Vergleich der Standardkurven für Hühnerserum und Hühnerblut zeigt, daß die geraden Kurventeile parallel sind (Abb. 16).

Die entsprechenden Formeln lauten:

$$\text{Hühnerblut: } y = 6,5 x + 1,96$$

$$\text{Hühnerserum: } y = 6,5 x + 1,76$$

Bezogen auf das Hühnerblut besteht für Hühnerserum der Korrekturfaktor - 0,2. Diese Tatsache ist unerwartet und derzeit nicht völlig zu erklären. Das Hühnerblut wurde zur Gerinnungshemmung mit einem Oxalatpuffer (Puffer II) im Verhältnis 1 : 3 verdünnt und dann anstelle von Serum in der Arbeitsverdünnung verwendet. Der Unterschied besteht nicht nur im Vorhandensein korpuskulärer Anteile sondern auch in einem höheren Puffergehalt, der möglicherweise, wie der Versuch einer Standardkurvenaufstellung mit reiner Pufferlösung ergab, eine verbesserte Diffusion von 81.723 hfu bedingt haben könnte. Die Parallelität der Blut- und Serumkurve zeigt jedoch, daß noch vergleichbare Diffusionsbedingungen vorhanden waren und mit Vollblut anstelle von Serum gearbeitet werden kann.

Für Taubenblut und Taubenserum (Abb. 17) gelten dieselben Feststellungen. Der gerade Anteil der Standardkurven liegt zwischen den Konzentrationsstufen 0,8 und 1,6 mcg/ml und ist parallel. Die Formeln der Kurven lauten:

$$\text{Taubenblut: } y = 6,0 x + 1,80$$

$$\text{Taubenserum: } y = 6,0 x + 1,66$$

Bezogen auf das Taubenblut besteht für Taubenserum der Korrekturfaktor - 0,14.

Die 12,5 % 81.723 hfu-Lösung wurde vor der Verabreichung an die Versuchsvögel mit physiologischer Kochsalzlösung so verdünnt, daß die Dosis von 50 mg/kg Kgw mit einer Tuberkulinspritze noch einigermaßen genau abgemessen werden konnte. Die Applikation in die Pektoralismuskulatur wurde von allen Tieren ohne klinische Symptome ertragen.

Lediglich bei 12 Tauben war an der Injektionsstelle nach 24 Stunden eine geringgradige Schwellung (Blaufärbung) sichtbar (möglicherweise in Folge einer Gefäßverletzung), die ohne Komplikationen im Verlauf der nächsten Tage verschwand.

Bei Tauben wurde im Serum der max. Blutspiegel nach 1 Std. erreicht (Abb. 18). Der Titer fiel dann rasch ab und war nach 10 Std. unter den therapeutisch wirksamen Mindestspiegel von 1 mcg/ml abgesunken.

Tab. III:

h. p. appl.	1/2	1	2	4	6	8	10	12	24/48
$\bar{x}$	4,330	7,910	5,675	3,810	1,677	1,605	0,603	0,545	-
$s +$	0,772	0,480	0,819	0,194	0,183	0,259	0,170	0,026	-

Parallel zum Taubenserum wurde bei den gleichen Tieren auch eine Konzentrationsbestimmung mit Taubenblut durchgeführt.

Tab. IV:

h. p. appl.	1/2	1	2	4	6	8	10	12	24/48
$\bar{x}$	4,404	8,220	4,568	3,257	1,476	1,250	-	-	-
S $\bar{+}$	0,106	0,986	0,233	0,146	0,293	0,143	-	-	-

Obige Tabelle ergab, daß der max. Blutspiegel ebenfalls nach 1 Std. erreicht war, um dann schnell abzufallen. Nach 10 Std. waren überhaupt keine Blutspiegelwerte mehr festzustellen.

Beim Nymphensittichblut (Tab. V) wurden therapeutisch wirksame Blutspiegel ebenfalls nach der 1. Std. und über 8 Std. nachgewiesen. Nach 10 Std. waren keine meßbaren Blutspiegel mehr vorhanden. Das gleiche gilt für die Amazonen (Tab. VI).

Tab. V:

h.p.appl.	1	4	8	10	12
$\bar{x}$	4,050	2,007	1,320	-	-
S $\bar{r}$	0,562	0,060	0,122	-	-

Tab. VI:

h.p.appl.	1	4	8	10	12
$\bar{x}$	5,955	2,995	1,905	-	-
S $\bar{r}$	0,077	0,217	0,276	-	-

Es wurde in den Tabellen V und VI so abgelesen, daß Nymphensittich- bzw. Amazonasblut gleich Serum ist. Die Annahme ist mit Sicherheit nicht völlig korrekt. Auf Grund der Erfahrungen bei Hühnern und Tauben kann damit gerechnet werden, daß die Ergebnisse etwas zu hoch sind.

Diskussion:

Die Methodik zur Aufstellung der Standardkurven führte zu gut reproduzierbaren Ergebnissen. Es erwies sich jedoch als notwendig als Verdünnungsmedium für die Eichkurven artspezifisches Serum zu verwenden. Pufferlösungen und auch Rinderalbumin (Abb. 12) eigneten sich hierfür nicht.

Die verwendeten Seren ergaben im Mittelteil gerade Eichkurven während an den oberen und unteren Enden des vorgegebenen Konzentrationsbereiches geringfügige Abweichungen von der Geraden auftraten. Die für jede Tierart individuell verlaufende Standardkurve (lediglich die Kurven für Tauben und Enten (Abb. 15) waren in ihrem Mittelstück identisch) ließen sich auf Grund des Verlaufes in 3 Gruppen einteilen, wobei in 2 Gruppen jeweils parallel verlaufende Kurven zusammengefaßt wurden (Abb. 14 und 15), während in der 3. Gruppe die aus dem Rahmen fallenden Kurven für Amazonen und Hühner (Abb. 1 und 7) stehen. Die Standardkurven innerhalb der Gruppen 1 und 2 unterscheiden sich nur bezüglich des Schnittpunktes mit der y-Achse und lassen sich daher mittels eines additiven bzw. subtraktiven Korrekturfaktors aufeinander beziehen, d.h. mit nur einer Standardkurve der betreffenden Gruppe lassen sich die Werte für alle in dieser Gruppe befindlichen Tierarten rechnerisch ermitteln.

Die Abweichungen der Standardkurve von der Geraden (am oberen und/oder unteren Ende) weisen darauf hin, daß das benutzte System eine nicht lineare Funktion darstellt, dessen Mittelteil aber soweit einer Geraden angenähert ist, daß sie als solche mathematisch verwendet werden kann ($r^2 = 0,96 - 0,99$). Dies bedeutet aber auch, daß die Ablesung von Blutspiegelwerten und die Benutzung von Umrechnungsfaktoren nur im geraden Teil zulässig ist, da anderenfalls die Fehlerquote zu hoch wird. Die Seren der Versuchstiere wurden deshalb bis zu den entsprechenden Konzentrationsbereichen verdünnt und dann erneut die Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Dadurch erhöhte sich erwartungsgemäß die Standardabweichung der Ergebnisse, da neben dem "Verdünnungsfehler" auch kleinste Ungenauigkeiten der Hemmhofablesung vervielfacht in die Rechnung eingingen.

Die individuellen Standardkurven für die verschiedenen Tierarten können als Hinweis dafür gewertet werden, daß eine Bindung an Serumfaktoren vorliegt. Die großen Hemmhöfe, die mit dem Rinderalbumin auftraten, sprechen dafür, daß die Albuminfraktion nicht der Hauptbindungsort ist. Es dürften vielmehr andere Serumfaktoren und möglicherweise bei den einzelnen Tierarten nicht identische Faktoren eine Rolle spielen, wobei man allerdings unterscheiden müßte zwischen struktureller und funktioneller Identität (HEILMEYER, 1968).

Auf jeden Fall gibt es bei den verschiedenen Tierarten im Serum Bindungen, die zu unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten führen.

Die Tatsache, daß es zu parallelen Kurvengruppen kommt, spricht dafür, daß diese unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten jedoch in einem einfachen mathematischen Verhältnis zueinander stehen. Dies kann als Hinweis dafür gewertet werden, daß die Bindungen selbst nicht vollständig verschieden sind, sondern daß nur geringe molekulare oder sogar nur pH- bzw. pK-Wert-abhängige Unterschiede bestehen.

Bei 4 Vogelarten (Ente, Taube, Bussard und Nymphensittich) gab es nach der Verdünnung des Serums mit dem Puffer der Stammlösung des 81.723 hfu Niederschläge.

Ein Einfluß auf die Standardkurve konnte nicht festgestellt werden. Der Grund für die Niederschläge und deren chemische Natur wurden nicht festgestellt. Auffällig ist, daß die 4 betroffenen, taxonomisch sehr unterschiedlichen Vogelarten auch alle in derselben Gruppe parallel verlaufender Standardkurven sind, und daß Ente und Taube sogar vollständig identische Kurven im geraden Anteil aufweisen. Dies spricht dafür, daß trotz Fehlens enger verwandtschaftlicher Beziehungen ähnliche Serumfaktoren vorhanden sein müssen, zumindestens was die Bindung von 81.723 hfu und die Empfindlichkeit gegen den verwendeten Puffer anbelangt.

Der Vergleich zwischen Hühnerblut und Hühnerserum bzw. Taubenblut und Taubenserum zeigt, daß in beiden Fällen die mit Vollblut gemessenen Hemmhöfe um den Faktor 0,2 bzw. 0,14 größer sind. Als einzige Ursache dafür wurde

der höhere Gehalt an Puffer festgestellt, wobei das Diffusionsgleichgewicht zu gunsten des Blutes mit niederem Proteingehalt verschoben wird. Die beiden Kurven sind jedoch noch vergleichbar, da die Standardkurven im mittleren Teil parallel verlaufen und nur im nicht mehr geraden Teil voneinander abweichen. Mit Hilfe des Umrechnungsfaktors kann rechnerisch von einer auf die andere Kurve geschlossen werden.

Der Verlauf der Konzentrationskurven des Taubenserums (Abb. 18), Nymphensittichblutes (Abb. 19) und Amazonenblutes (Abb. 20) folgte bei der graphischen Darstellung Kurven, die e-Funktionen gleichen. Die in Abb. 18 - 20 dargestellten Kurven sind Mittelwertskurven, deren Standardabweichungen aus Tab. III, IV und V zu entnehmen sind. Die Standardabweichungen sind bei den 1- und 2 Stundenwerten auffällig erhöht, was die Folge der notwendigen Verdünnungen sein dürfte, um im geraden Teil der Standardkurve ablesen zu können.

Die nach i.m. Applikation ermittelten Blutspiegel zeigen, daß der max. Blutspiegel generell bereits nach einer Stunde erreicht wird. Der Verlauf der Serumkonzentration (Tauben) und der Blutspiegel (Nymphensittich und Amazone) läßt sich graphisch in einer Kurve darstellen, die die Form einer e-Funktion aufweist (Abb. 18 - 20). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß keine mikrobiell aktiven Metaboliten in größerer Menge auftreten. Die therapeutisch

wirksamen Blutspiegel sind nach parenteraler Applikation der genannten Dosis bei Taube, Nymphensittich und Amazone nur maximal 8 Std. nachweisbar, was für eine Therapie bei der üblichen 1 x täglichen Applikationsweise wenig ist. Eine andere Applikationsform (höher und/oder öfter) oder gegebenenfalls eine Hemmung der Elimination bzw. der Resorption aus dem i.m. -Depot wäre daher zu überlegen.

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, daß die Auswertung von Blutspiegeln bei den in der tierärztlichen Praxis vorgestellten Vogelspezies zu Schwierigkeiten führt, sofern nicht speziesspezifische Standardkurven vorhanden sind. Sie hat weiter bestätigt, daß Analogieschlüsse von einer Vogelart auf die andere außerordentlich irreführend sein können.

Bei den 3 untersuchten Vogelarten werden bei guter Verträglichkeit (50 mg/kg Kgw) hohe Anfangsblutspiegel gemessen. Die Dauer der therapeutisch wirksamen Konzentration dürfte jedoch in keinem Fall 8 Stunden überschreiten.

Zusammenfassung:

81.723 hfu ist ein Pleuromutilinderivat, das in der Vogelpraxis als Therapeutikum gegen Mykoplasmen und gram-pos. Bakterien eingesetzt werden kann. Als Voraussetzung für eine solche Anwendung sollte festgestellt werden, ob die Substanz nach parenteraler Applikation (50 mg/kg Kgw) einen therapeutischen Blutspiegel erreicht und ob sie klinisch verträglich ist.

Für die Messung der Blutspiegel wurden Standardkurven aufgestellt (Abb. 1 - 13), die zeigten, daß für jede Tierart eine eigene Standardkurve erhalten und daher die Substanz bei den verschiedenen untersuchten Tierarten vermutlich speziesspezifisch unterschiedlich an Serumfaktoren gebunden wird.

Die Eichkurven wurden untereinander verglichen und die geraden Teile dieser Kurven mathematisch in Beziehung zueinander gebracht. Bei Kurven mit identischer Steigung wurde ein Faktor errechnet, mit dessen Hilfe von einer Kurve auf eine andere mit gleicher Steigung geschlossen werden kann. Bei den untersuchten Tierarten wurden 2 Kurvengruppen mit identischer Steigung festgestellt. Es wurde weiterhin gefunden, daß zwischen Serum und Vollblut derselben Tierart zwar identische Steigungen (Abb. 16 und 17) aber unterschiedliche Ordinatenabschnitte der Diagramme bestehen (unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungen).

Die Hemmhöfe, die mit Vollblut gemessen wurden, waren

regelmäßig größer als die mit Serum.

Bei den untersuchten Vogelarten erreichte der Blutspiegel (50 mg/kg Kgw i.m.) nach 1 Std. ein Maximum und sank im Verlauf nach 8 Stunden (Tab. 3 - 5) unter therapeutische Mindestwerte ab.

Summary:

81.723 hfu is a pleuromutilin derivate that may be employed in medical attention to birds as therapeutic means against mycoplasmas and gram-positive organisms. As presupposition of such an application it should be ascertained whether the substance achieves a therapeutically active blood level after parenteral application (50 mg/kg body weight) and whether it is clinically compatible.

Standard curves have been set up for the measurement of the blood levels (f. 1 - 13). For each species of bird an own typical standard curve has been found indicating that the substance probable is specifically differentially bound at serum-factors within the different species.

The different curves have been compared with regard to their linear sections. For curves with identical slopes a factor has been computed by means of which conclusions can be drawn from one curve to another with identical slope.

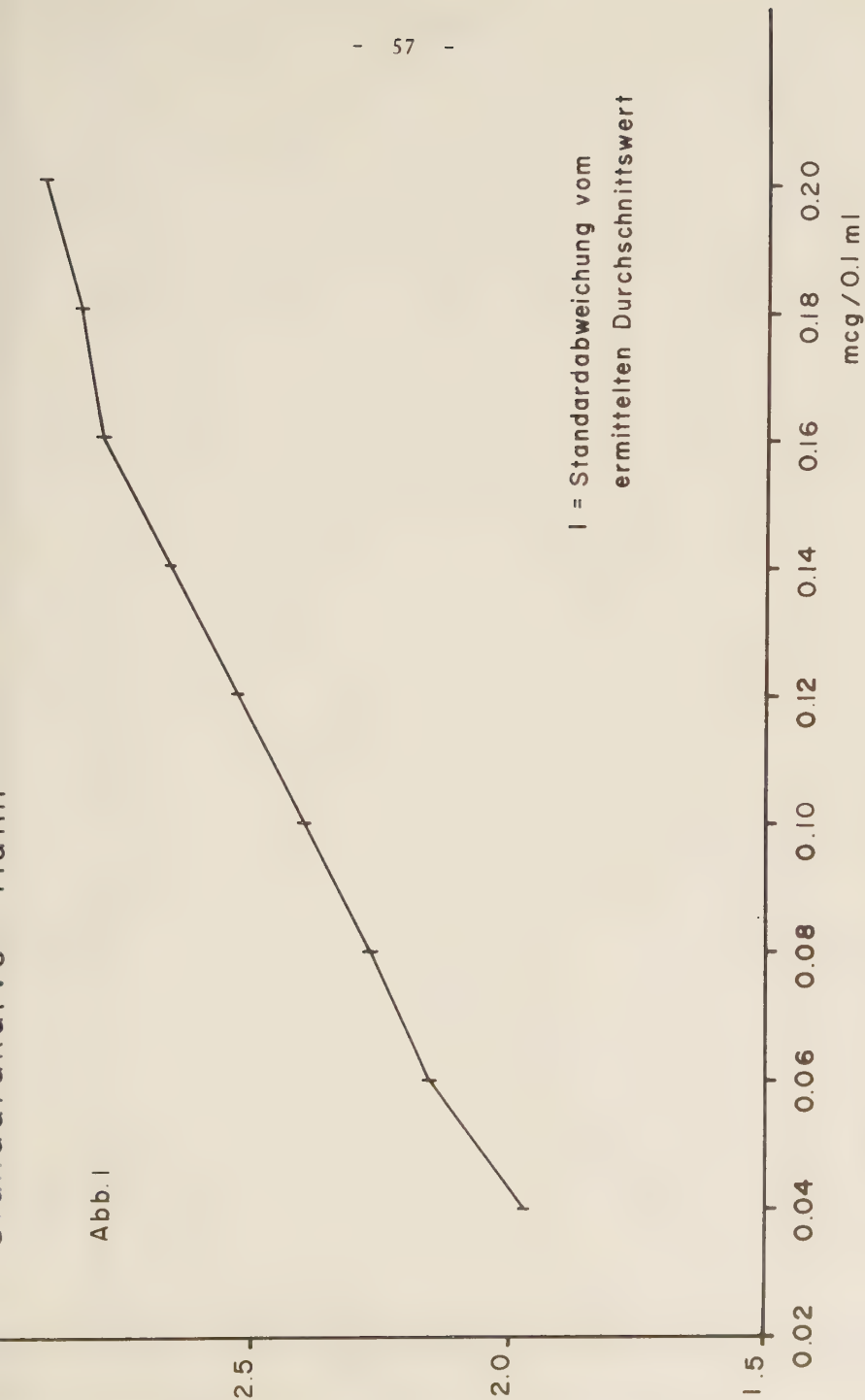
Within the examined species two groups of curves with identical slope could be determined. Furtheron it has been found that the ordinate exist in the diagrams of blood and serum (f. 16 and 17) (respecting different dilution) .

The inhibition zones measured with blood, regularly were greater than those measured with serum.

The blood level (50mg/kg body weight) of the examined species of bird reached a peak level after 1 hour and declined in the course of 8 hours under therapeutic minimum values.

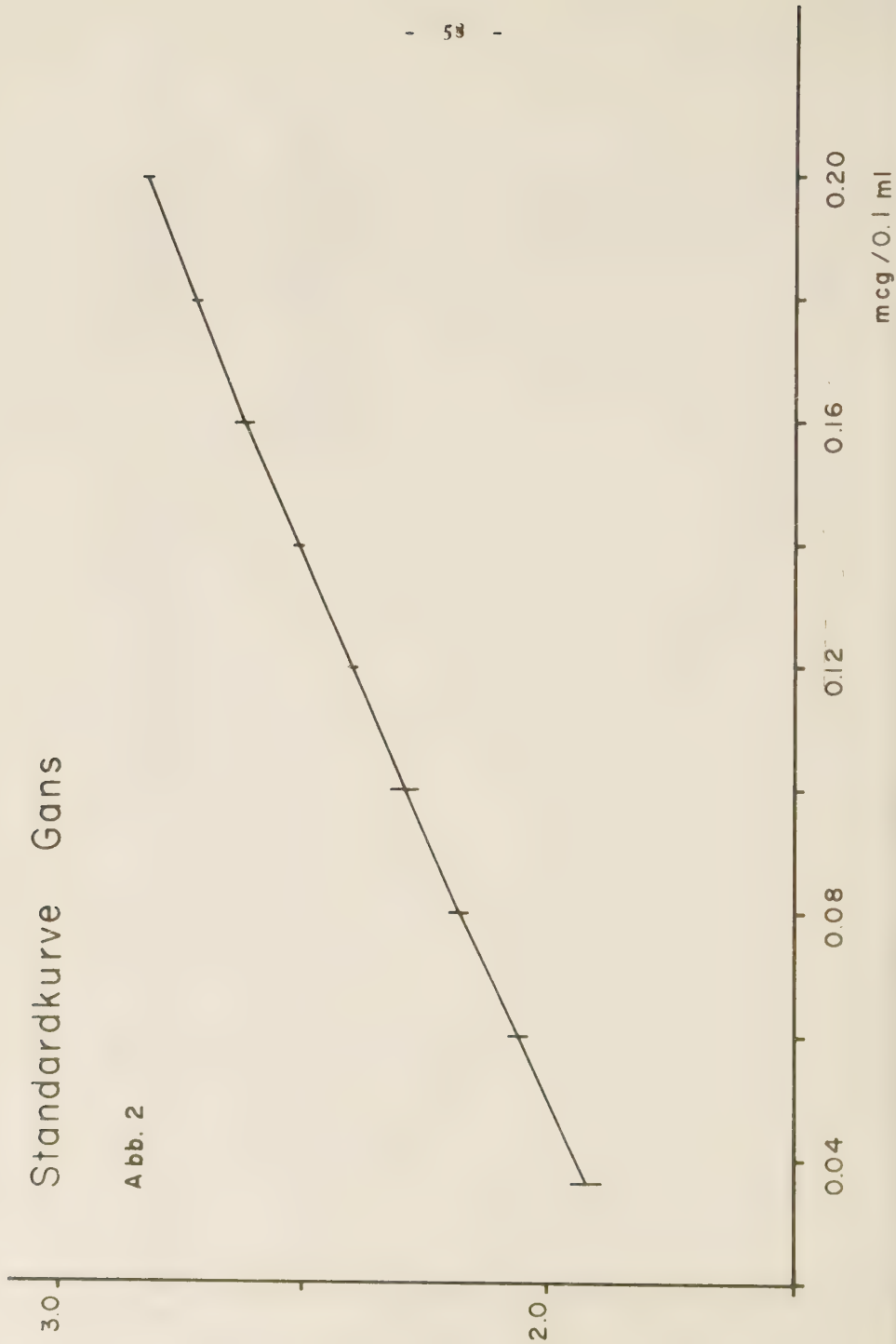
Abb. I

I = Standardabweichung vom
ermittelten Durchschnittswert



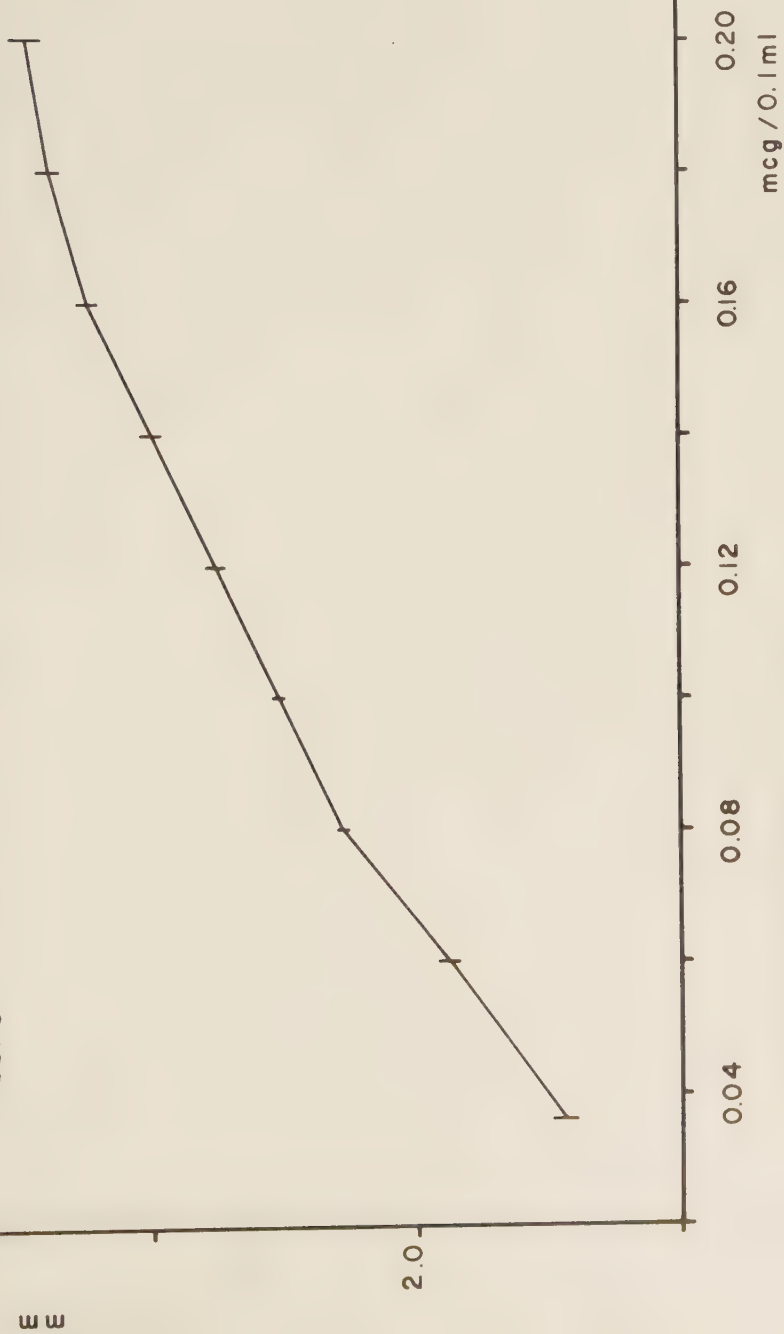
Standardkurve Gans

Abb. 2



Standardkurve Ente

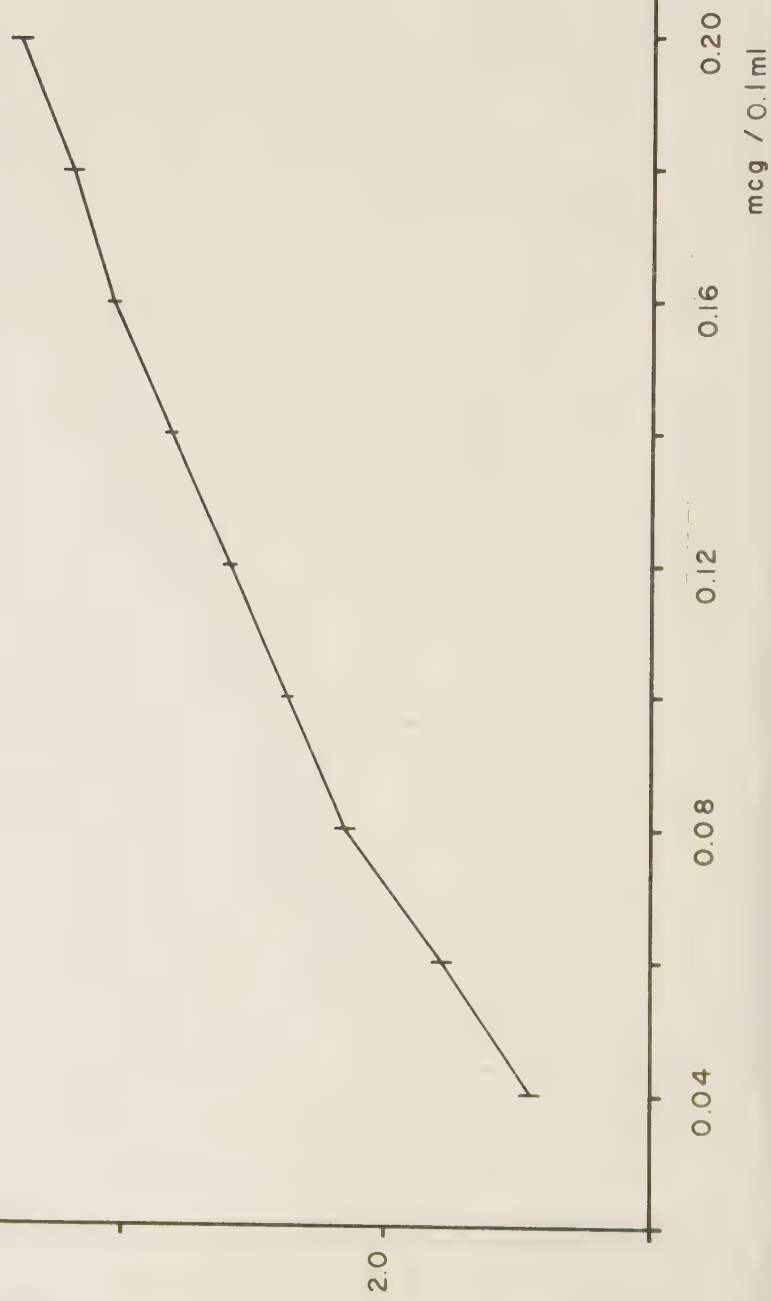
Abb. 3



Standardkurve Pute

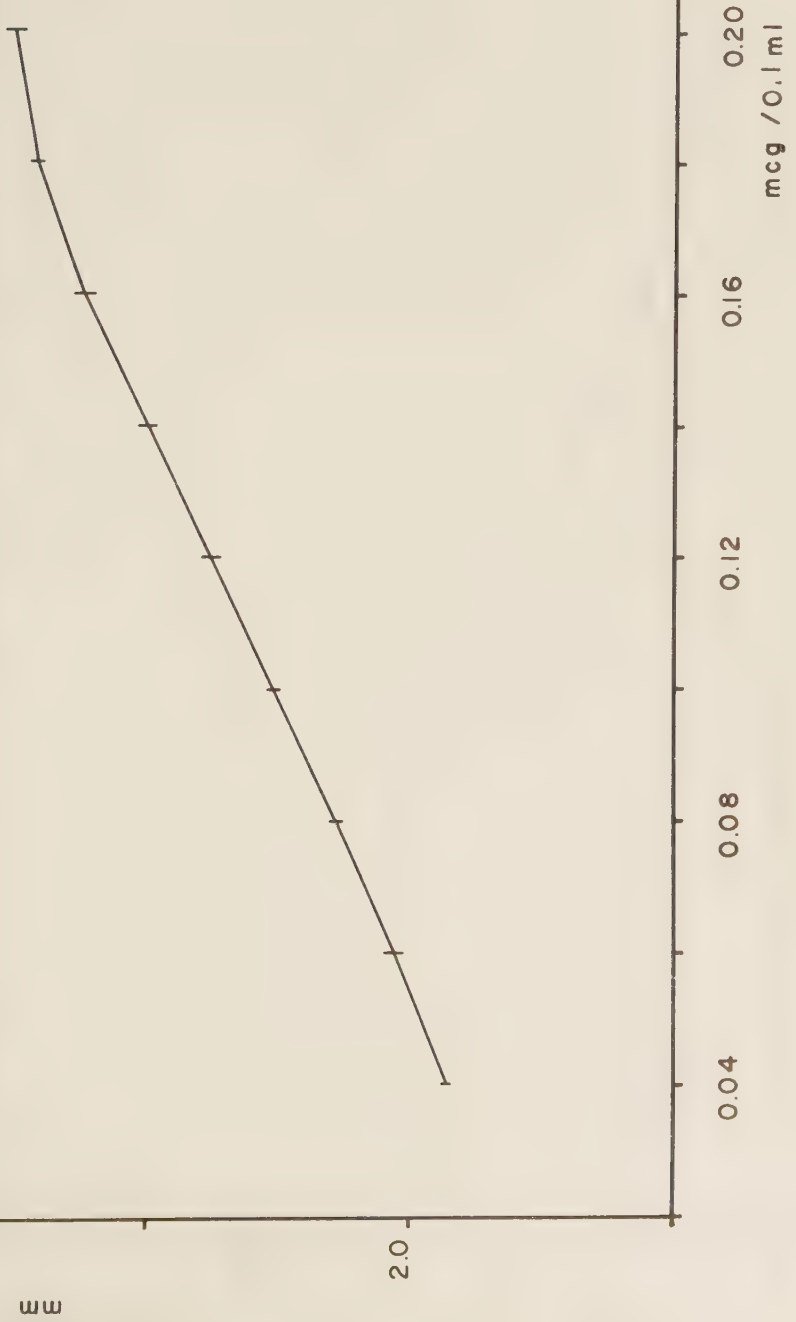
Abb. 4

EE



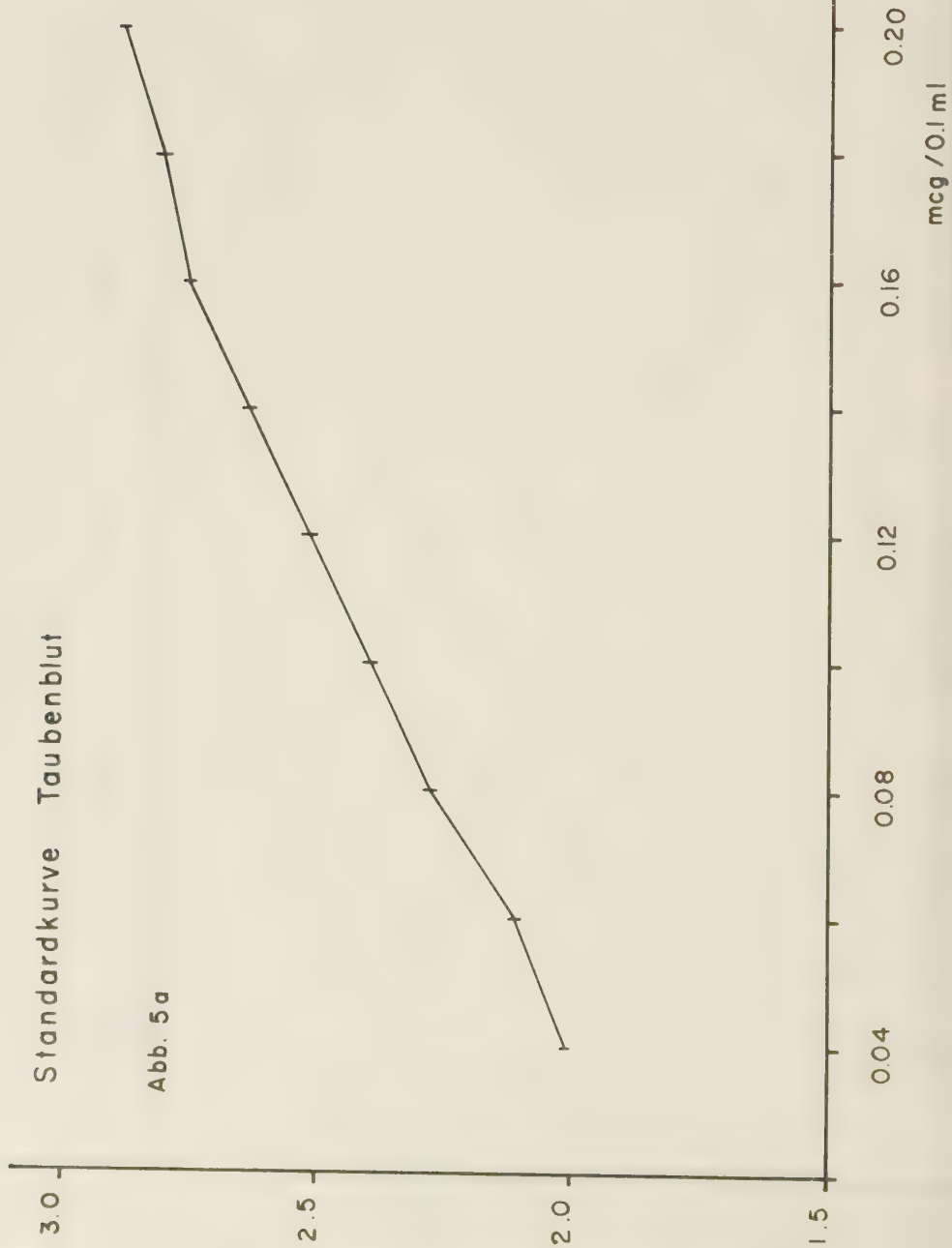
Standardkurve Taube

Abb. 5



Standardkurve Taubenblut

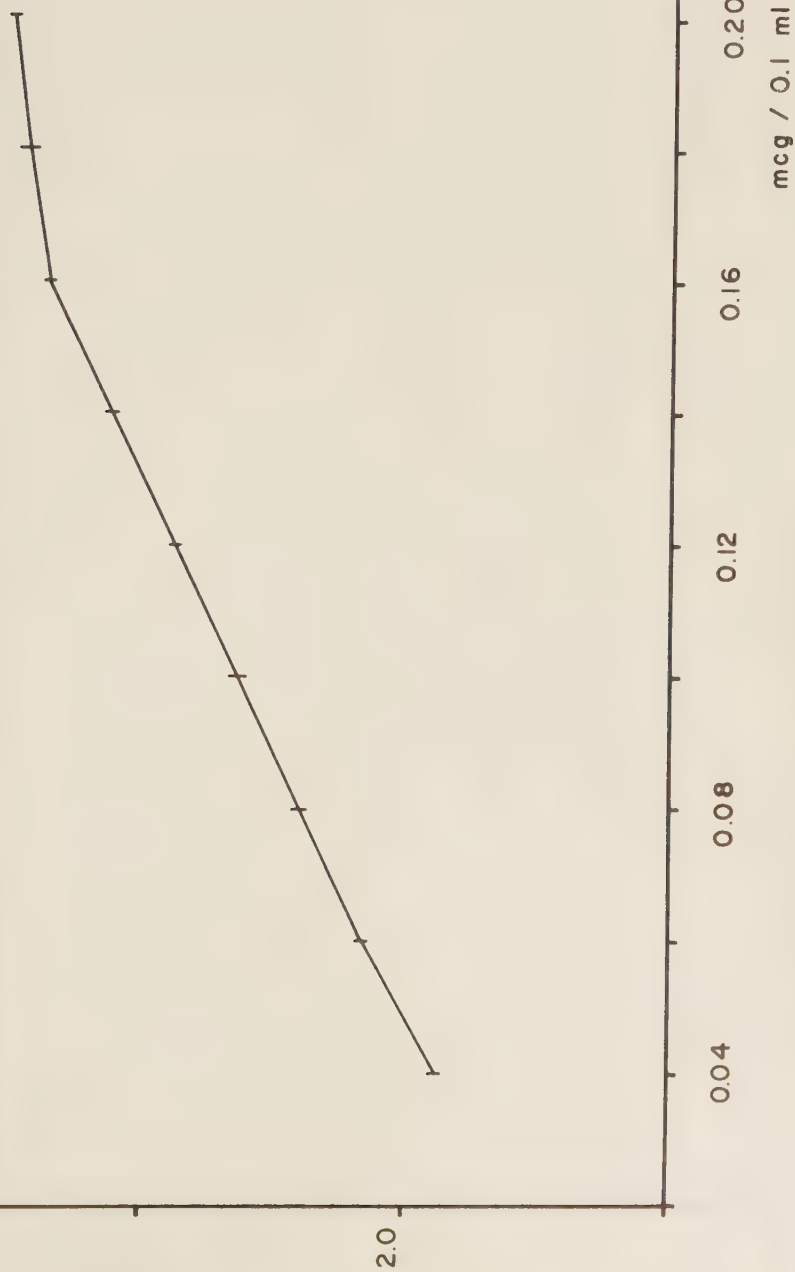
Abb. 5a



Standardkurve Nymphensittich

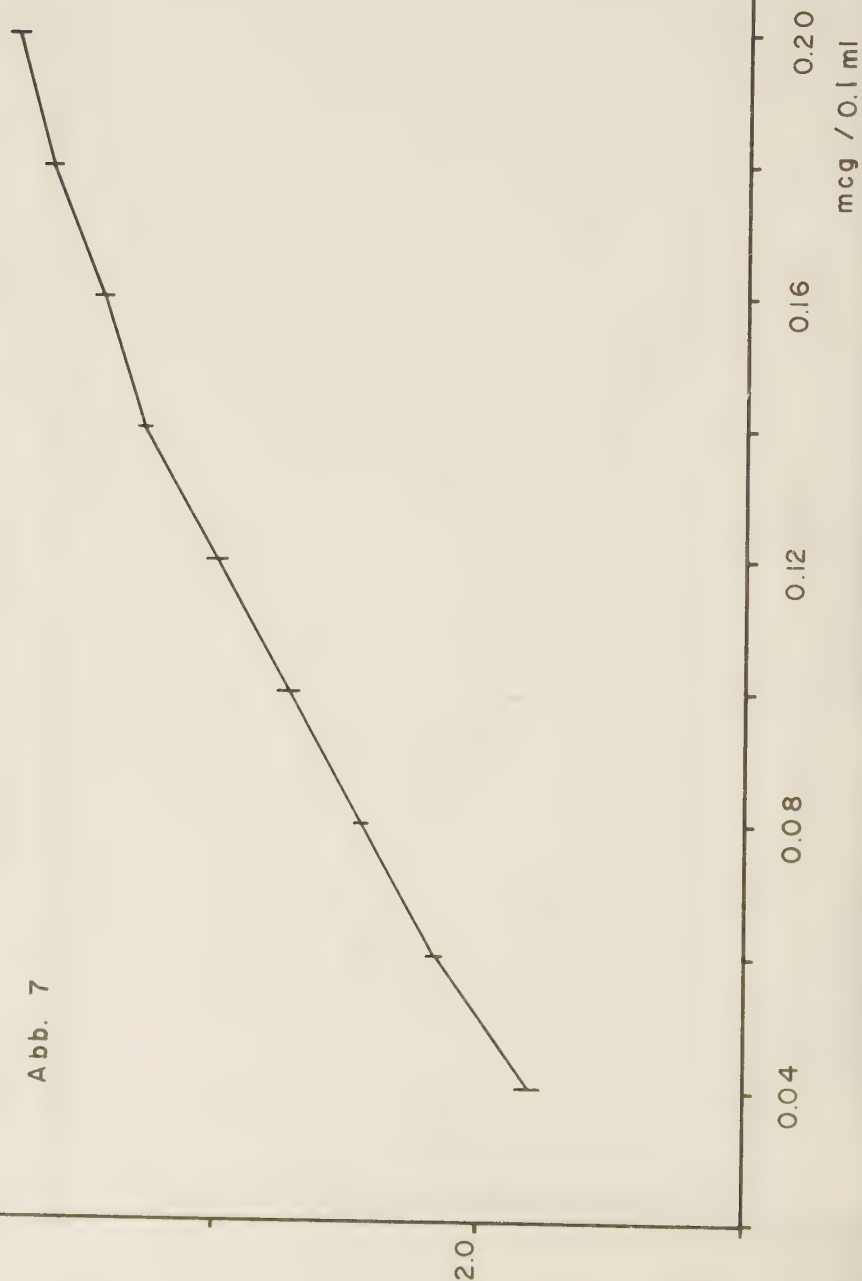
Abb. 6

EE



Standardkurve Amazone

Abb. 7



Standardkurve Bussard

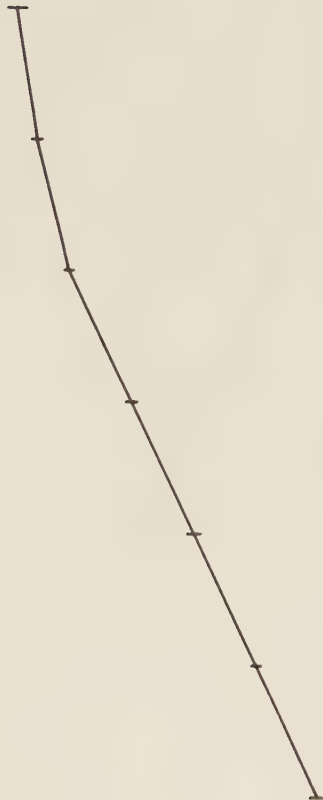
Abb. 8

mm

3.0

2.0

- 65 -



0.04

0.08

0.12

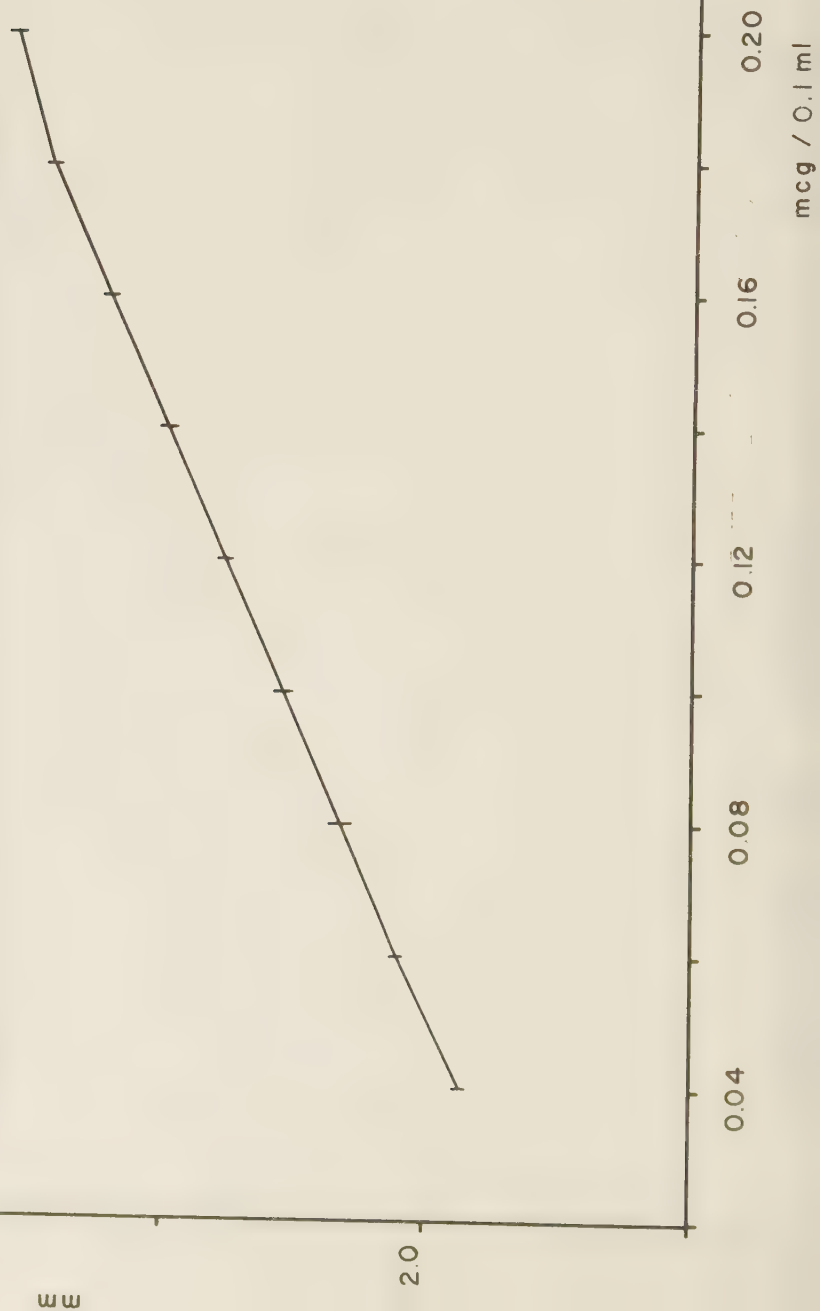
0.16

0.20

mcg / 0.1 ml

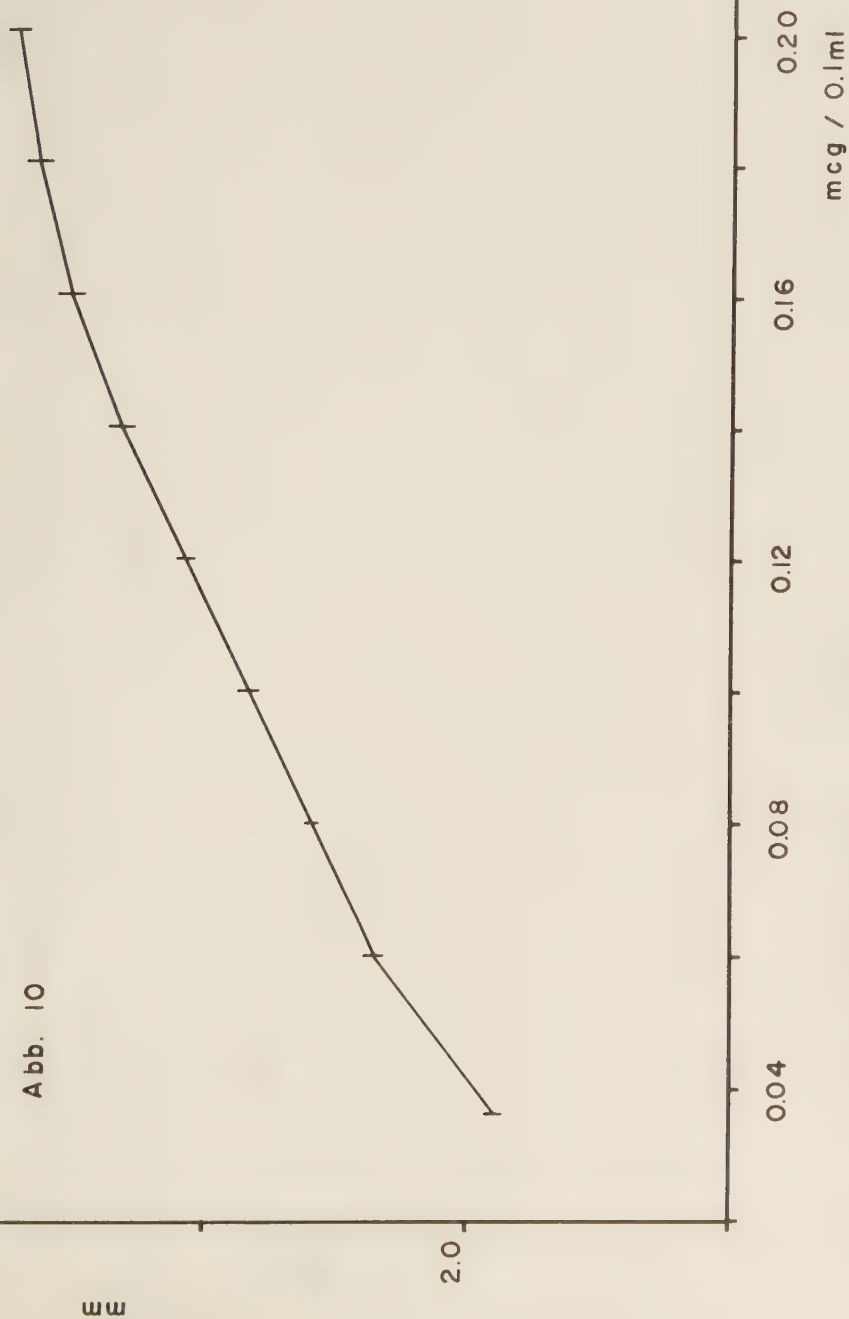
Standardkurve Pferd

Abb. 9



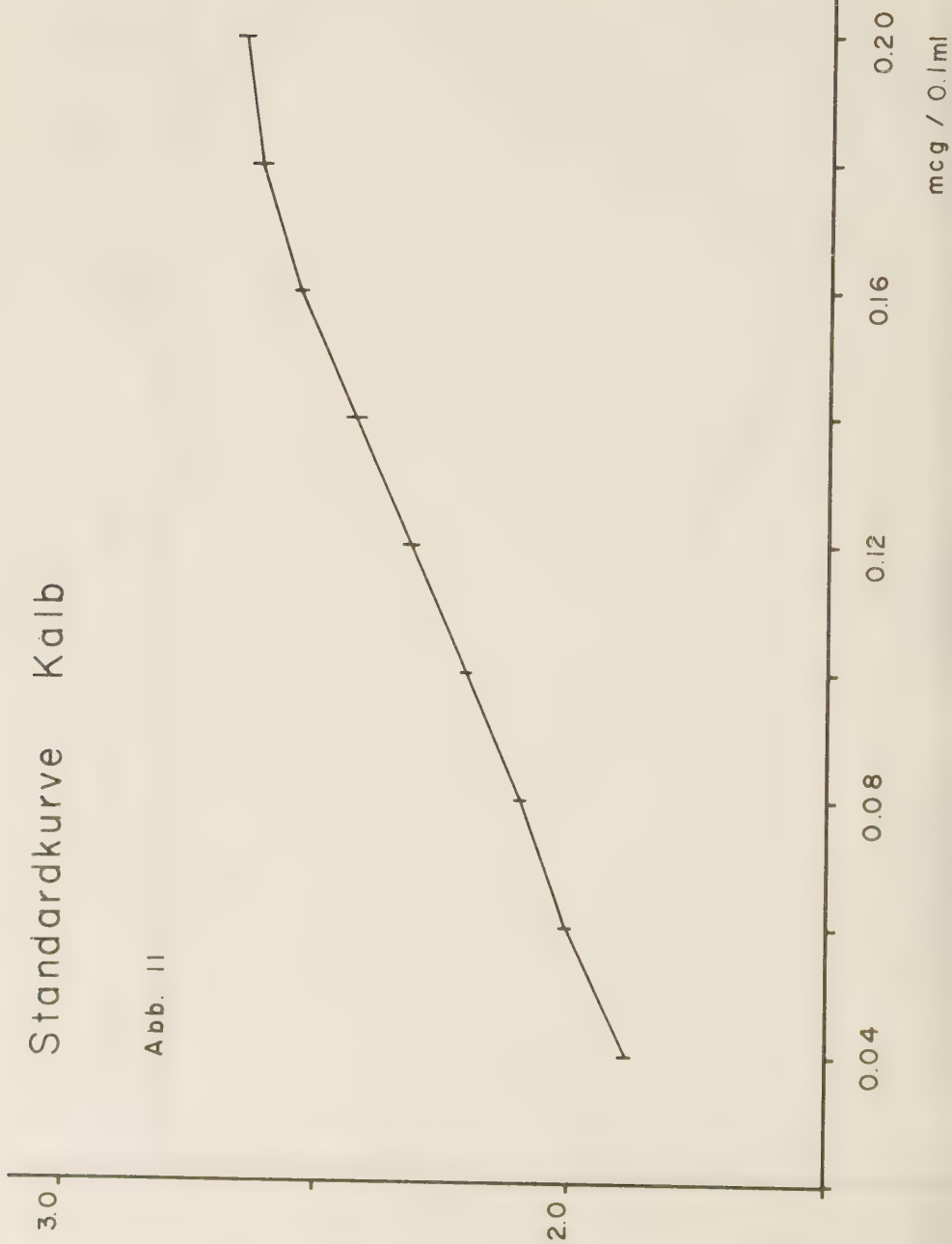
Standardkurve Hammel

Abb. 10



Standardkurve Kalb

Abb. 11



Standardkurve Rinderalbumin

Abb. 12

EE

3.0

2.0

0.04

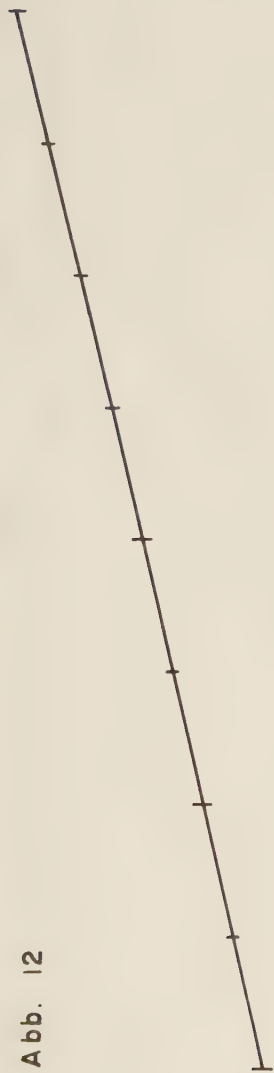
0.08

0.12

0.16

0.20

mcg / 0.1 ml



Standardkurve Hühnerblut

Abb. 13

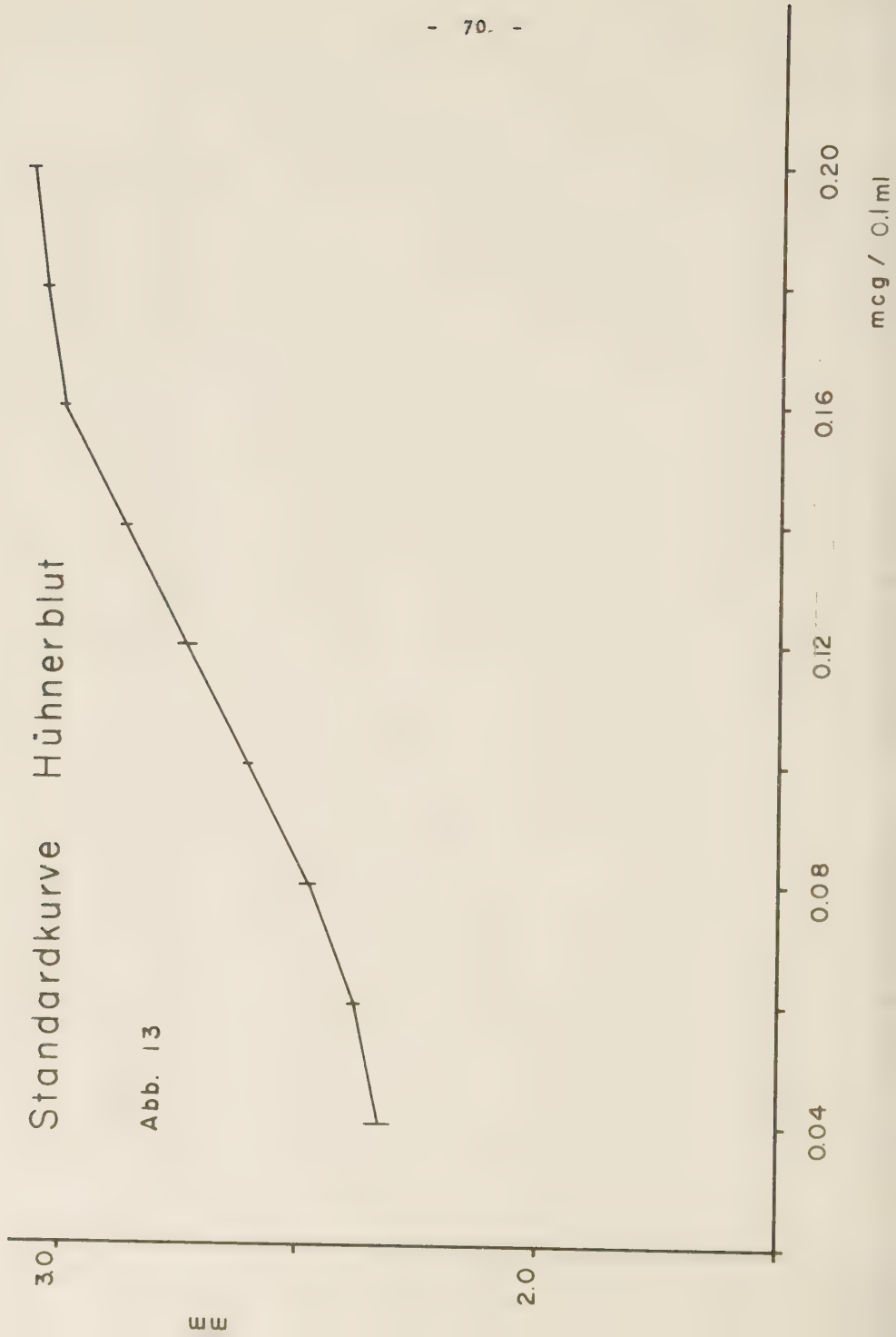


Abb. 14

ε ε

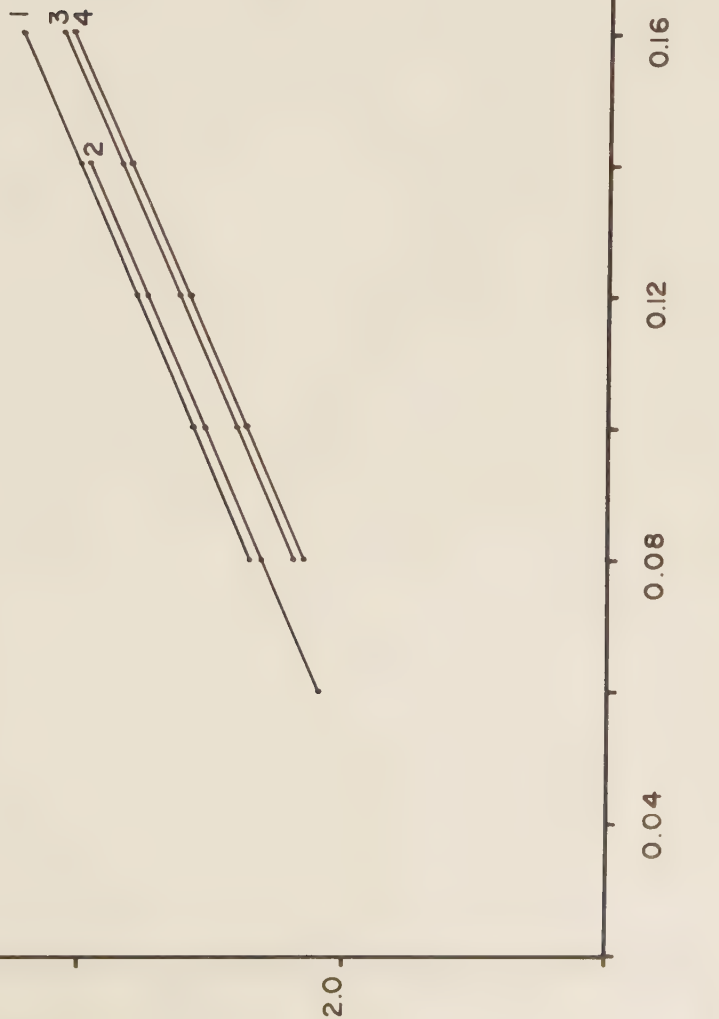


Abb. 15

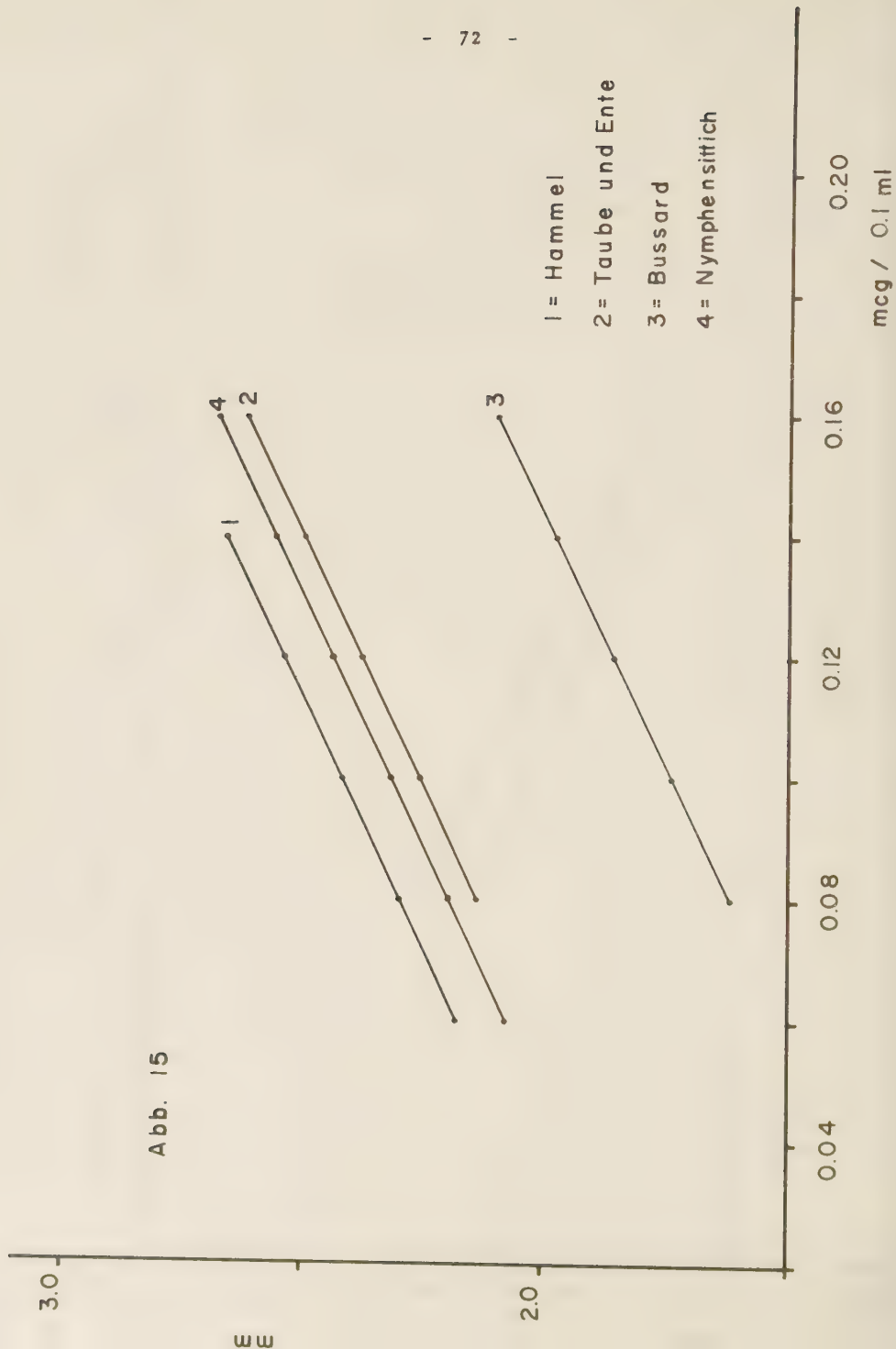


Abb. 16

1 = Hühnerblut
2 = Hühnerserum

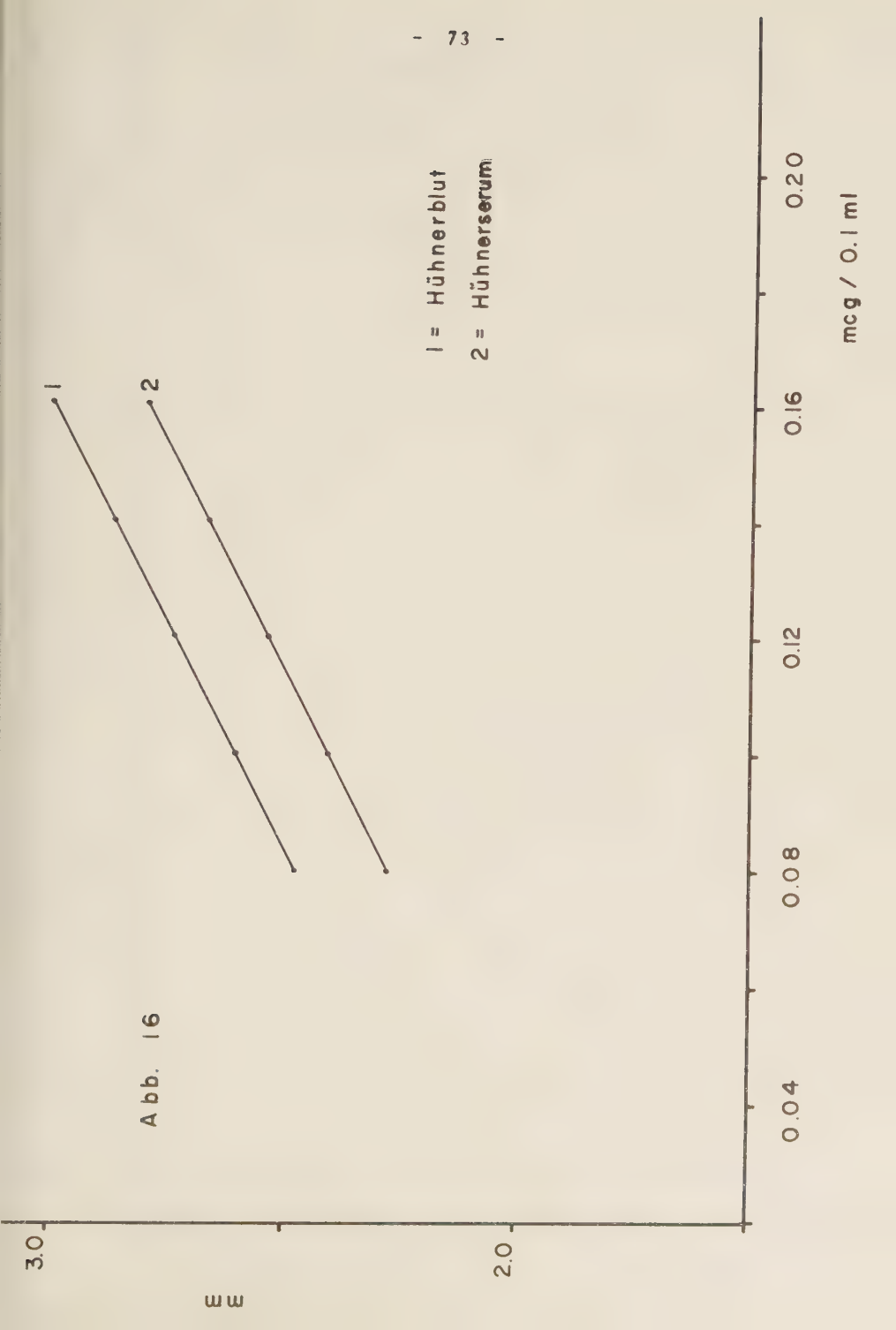
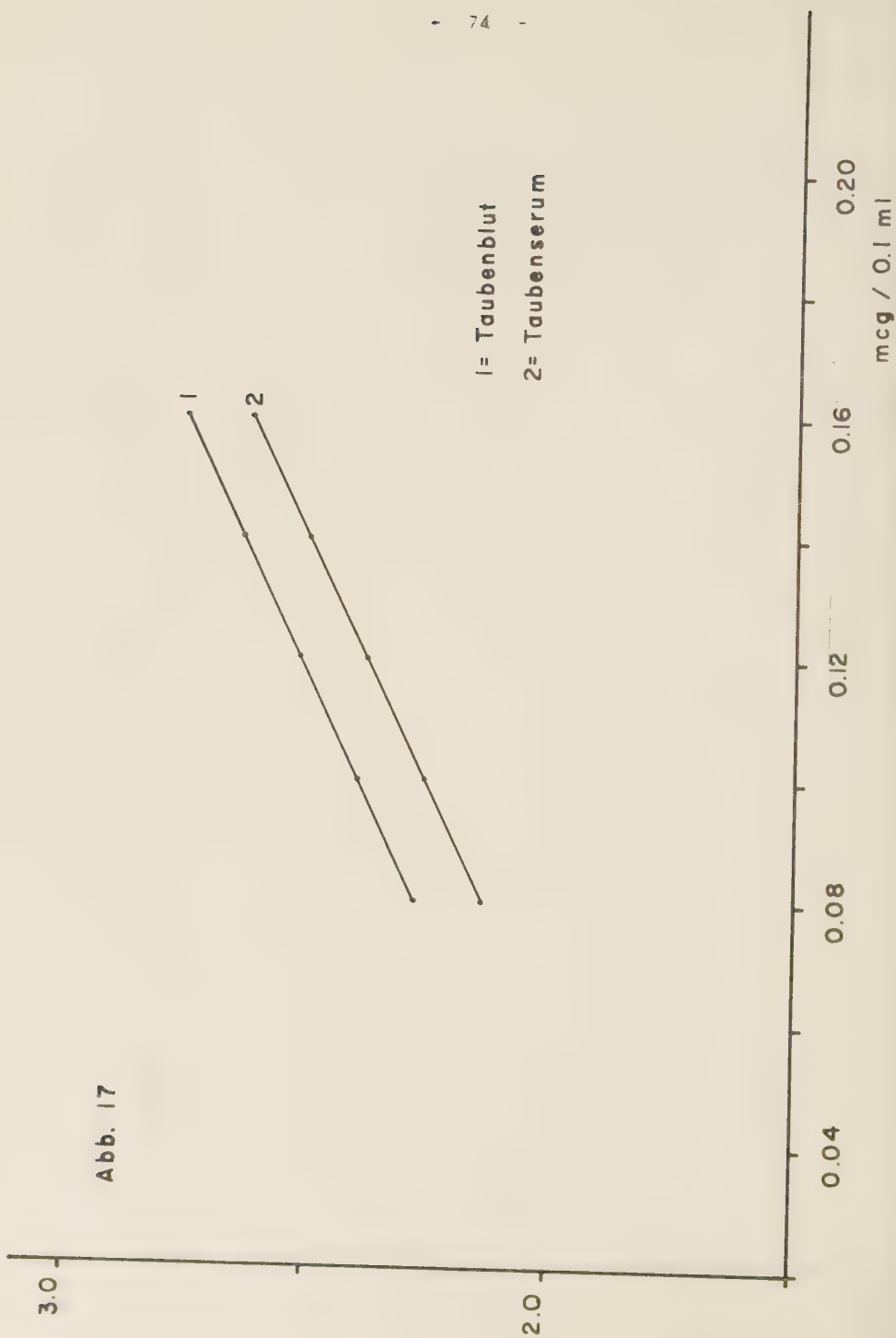


Abb. 17

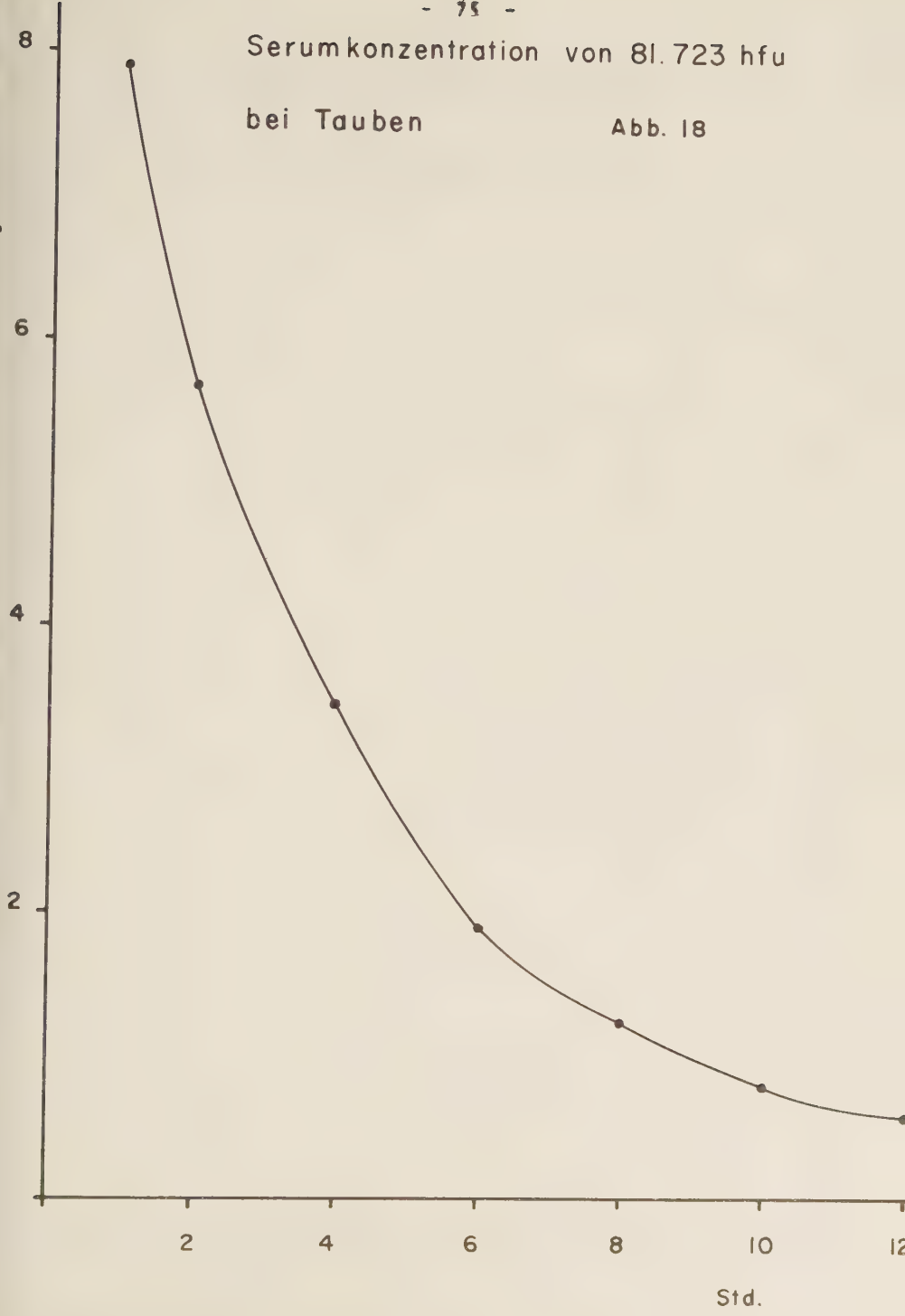


1 = Taubenblut
2 = Taubenserum

Serumkonzentration von 81.723 hfu

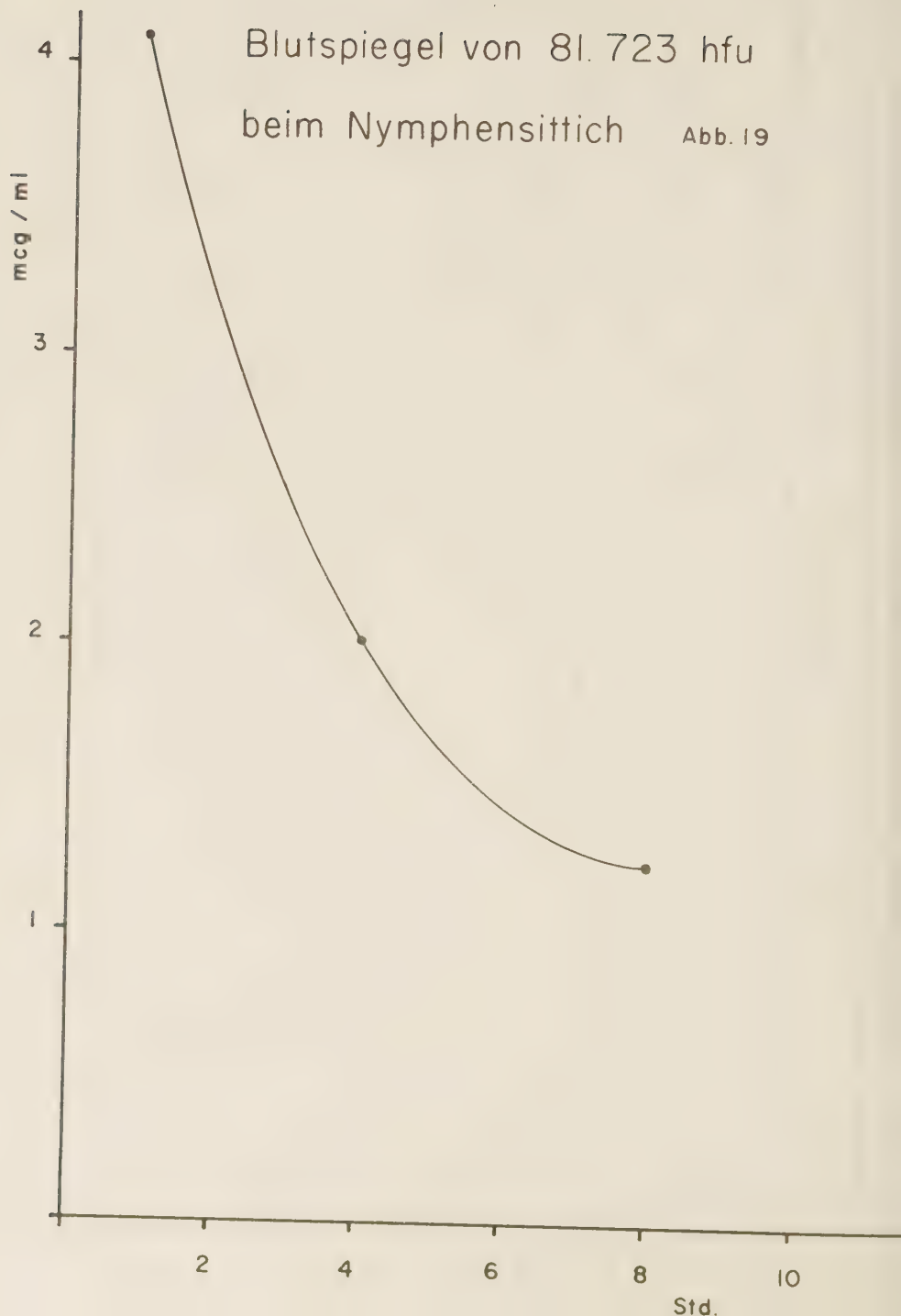
bei Tauben

Abb. 18



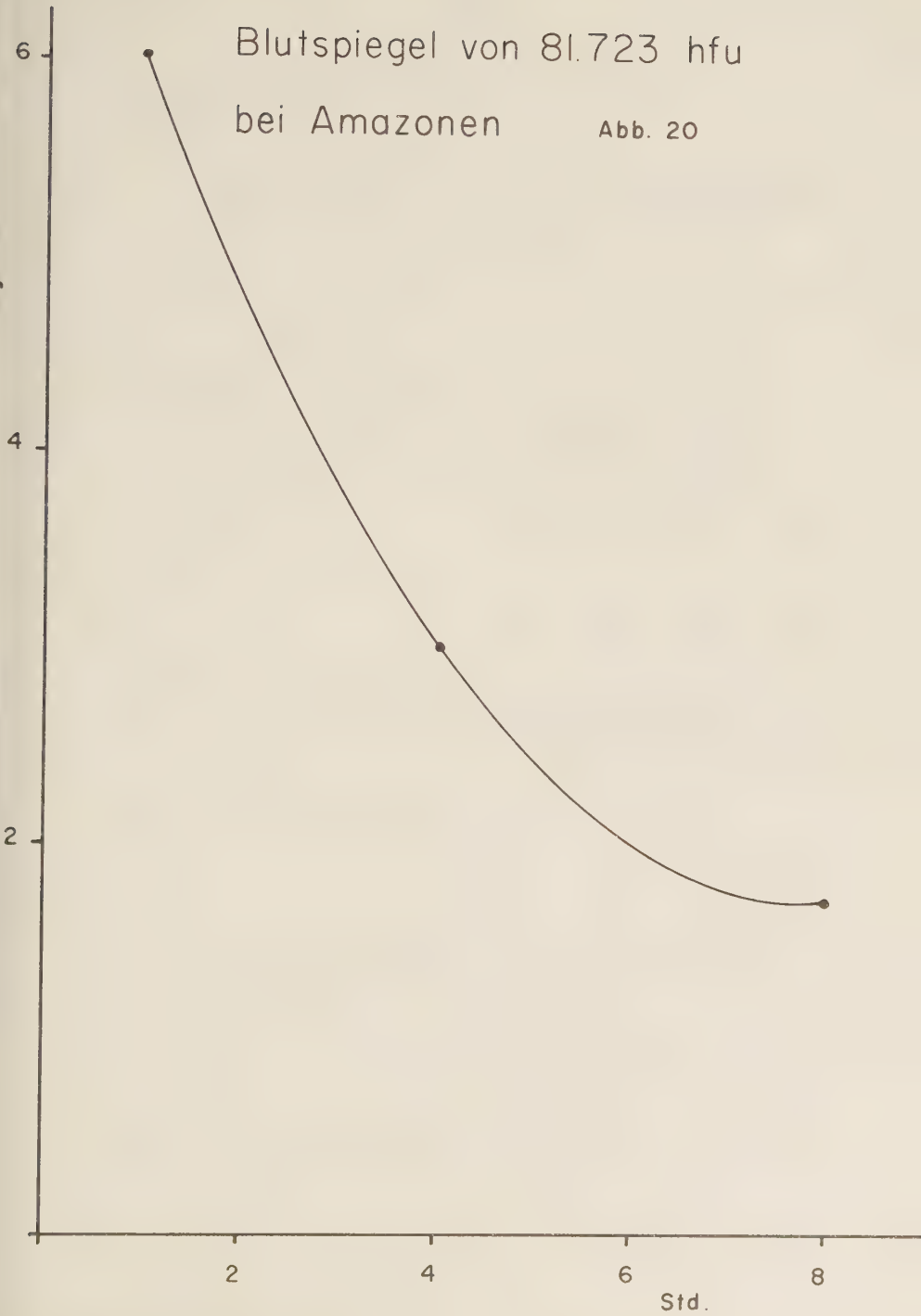
Blutspiegel von 8l. 723 hfu

beim Nymphensittich Abb. 19



Blutspiegel von 81.723 hfu
bei Amazonen

Abb. 20



Literaturverzeichnis:

ADAM, D. (1970)

Zur Frage der Bedeutung der Eiweißbindung für
die Chemotherapie von Infektionen.

Vortrag v. Internationaler Kongreß für Infek-
tionskrankheiten Wien, 31.8. - 5.9.1970

Kongreßbericht, Vol. 2, S. 79

Verlag d. Wien. Med. Akad.

ADAM, D. und W. MAGRET (1971)

Die Rolle des Wirts bei der klinischen Wir-
kung der antibakteriellen Chemotherapie.

Med. Klin. 66, 10, 345

AICHINGER, R. (1957)

Blutspiegelbestimmungen nach parenteralen
Penicillin- und Streptomycingaben beim Huhn.

Diss. med. vet. Wien

ARMITAGE, P. (1971)

"Statistical Methods in Medical Research".

Blackwell Scientific Publications

Oxford and Edinborough S. 150 - 156

BECHINGER, A. (1914)

Blutuntersuchungen bei gesunden Tauben,
Enten und Gänsen.

Diss. ~~med. vet.~~ Leipzig

BENNHOLD, H.; E. KYLIN und S. RUSZNAK (1938)

Die Eiweißkörper des Blutplasmas.

Theodor Steinkopff-Verlag, Dresden und Leipzig

BRUNNER, R. und G. MACHEK (1962)

" Die Antibiotika "

Band I: Die großen Antibiotika

1. Teil, Allgemeiner Teil, Penicillin

Verlag Hans Carl, Nürnberg

DREWS, J., A. GEORGOPOULOS, G. LABER, E. SCHÜTZE und
J. UNGER (1975)

Antimicrobial activities of 81.723 hfu, a new
pleuromutilin derivate.

Antimicrob. Agents Chemother. 6, 507 - 516

EICHHOLZ, F. (1957)

Lehrbuch der Pharmakologie
Im Rahmen einer allgemeinen Krankheitslehre
für praktische Tierärzte und Studierende.

Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg

ERICSSON, H. (1964)

Standardization of Methods for Conducting
Microbic Sensitivity Tests.

Stockholm, Schweden

ERICSSON, H. (1967)

The international study on the standardization
of antibiotic sensitivity testing.

Memorandum Nr. 14

ERICSSON, H. und J. C. SHERRIS (1971)

Antibiotic Sensitivity Testing.

Acta Pathologica of Microbiologica Scandinavia

Section B, Supplement Nr. 217

FEIERSINGER, G. (1955)

Chloramphenicol (Chloromycetin)

Blutspiegelbestimmungen bei Pferd und Huhn.

Diss. ~~med. vet.~~ Wien

FRIMMER, M. (1969)

Pharmakologie und Toxikologie

Ein Textbuch für Studenten der Veterinärmedizin.

F. - K. Schattauer-Verlag, Stuttgart - New York

GEBHARDT, H. (1964)

Grundriß der Pharmakologie, Toxikologie und

Arzneimittelverordnungslehre.

Verlag Rudolph Müller und Steinicke, München

GERLACH, H. (1967)

Zur Resistenztestung gegen Antibiotika
und Sulfonamide.

Berlin. Münch. tierärztl. Wschr. 80, 231 - 234

GADDUM, J. H. (1952)

Pharmakologie

Übersetzung und Bearbeitung nach der dritten
englischen Auflage von Prof. Dr. med.

W. Schroeder.

Verlag von Dr. Dietrich Steinkopff, Darmstadt

GRABAR, P. und P. BURTIN (1960)

Analyse immuno - électrophorétique.

Masson und Cie., Paris

GROVE, D. C. und W. A. RANDALL (1955)

Assay Methods of Antibiotics. New York

HEBOLD, G. (1972)

Guidlines for the testing of drugs in
various countries.

Manuskript

Abt. für exp. Pathologie und Toxikologie

Boehringer, Mannheim

HEILMEYER, L. (1968)

Blut- und Blutkrankheiten

Teil 1: Allgemeine Hämatologie und Physio-
pathologie des erythrocytären Systems.

Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

in: Handbuch der Inneren Medizin (1968)
Begründet von L. Mohr und R. Staehelin
Herausgegeben von H. Schwiek, München

Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

HEIN, H. (1970)

Verfahren zur Bestimmung kleiner Mengen
von Neomycin

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 214, 259 - 261

HENSLER, R. (1961)

Die Bedeutung der Blutsenkungsreaktion nach Westergreen, in Verbindung mit Blutbildveränderungen, bei verschiedenen Hühnerkrankheiten.

Diss. med.vet. Gießen

HIRSCHBÜCHLER, J. (1955)

Der Blutspiegel verschiedener Tetracycline beim Huhn.

Diss. vet. Wien

HITZIG, W. W. (1961)

Zur quantitativen Bestimmung spezifischer Proteinfractionen. Methodische Untersuchungen mit besonderer Berücksichtigung immunchemischer Methoden.

Int. Arch. Allergy. 19, 284

HITZIG, W. W. (1963)

Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin.

Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg

JAKSCH, W. (1959)

Blutserumspiegelbestimmungen nach parenteralen
Gaben von Dibenzyläthlendiamin-di-Penicillin V
(DBED-Penicillin-V) bei Pferd, Schwein, Hund
und Huhn.

Wien. tierärztl. Mschr. 5, 388 - 397

JAKSCH, W., J. LUNZER, F. R. RABL, F. STRÖMER und
J. GROSS (1954)

Penicillin - Blutserumspiegelbestimmungen nach
peroralen Gaben von Phenoxymethyl - Penicillin
bei Pferd, Schwein, Hund und Huhn.

Wien. tierärztl. Mschr. 11, 687 - 707

KAVANAGH, F., A. HERVEY und W. J. ROBBINS (1951)

Antibiotic substances from *Basidomyces* VIII.
Pleurotus mutilis and *Pleurotus passeckerianus*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37, 570 - 574

KLEIKAMP, J. (1955)

Beitrag zur Antibiotikaspiegelbestimmung im

Blutserum und in Organsuspensionen bei Wellensittichen.

Monatsheft f. Tierheilkunde 15, 107 - 109

KLEIN, P. (1957)

Bakt. Grundlagen der chemotherapeutischen
Laboratoriumspraxis. Berlin

KLEIN, U. (1974)

Vergleichende Hämatologie, Gesamteiweißbestimmung und elektrophoretische Auftrennung im Polyacrylamidgel von Seren verschiedener Taubensassen.

Diss. ~~med. vet.~~ München

KLOTZ, J. M. (1957)

in: "Chemical Structure and Biological Specificity"
by Pauling, L. und Itano, H.

American Institute of Biological Science,
Washington, D. C., S. 91

KÜMMERLE, H. P., E. R. GARRET und K. H. SPITZY (1973)

Klinische Pharmakologie und Pharmakotherapie

Urban und Schwarzenberg, München - Berlin - Wien

KUSCHINSKY, G. und H. LÜLLMANN (1972)

Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie, 5. Auflage

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

MEIENHOFER, J. und H. Zahn (1960)

Gewinnung und Reindarstellung von Proteinen

in: Hoppe - Seyler/Thierfelder, Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse.

2. Aufl., Bd. IV/1

Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg

MERZ, K. W. (1965)

Grundlagen der Pharmakologie für Apotheker,
Chemiker und Biologen

Wiss. Verlagsanstalt M.B.H., Stuttgart

MEYNELL, G. G. und E. MEYNELL (1970)

Theory and Practice in Experimental Bacterio-
logy. 2 nd Edition

Cambridge University Press

MØLLER, K. (1966)

Pharmakologie als theoretische Grundlage
einer rationellen Pharmakotherapie.

Schwabe u. Co. Verlag, Basel - Stuttgart

MÜTSCHLER, E. (1973)

Arzneimittelwirkungen, ein Lehrbuch der Pharma-
kologie für Pharmazeuten, Chemiker und Biologen.

Wiss.-Verlagsanstalt M.B.H., Stuttgart

OBERZILL, W. (1962)

in: R. Brunner und G. Machek
" Die Antibiotika I "

Verlag Hans Carl, Nürnberg

OBERZILL, W. (1967)

Mikrobiologische Analytik.
Grundlagen der quantitativen Erfassung von
Umwelteinwirkungen auf Mikroorganismen.

Verlag Hans Carl, Nürnberg

PETERSDORF, R. G. und J. J. FLORDE (1963)

The usefulness of in vitro sensitivity tests
in antibiotic therapy.

Ann. Rev. Med. 14, 41 - 56

PETRAK, M. L. (1969)

Disease of cage and aviary birds

Lea and Febiger, Philadelphia

POHLMAYER, K. und H. WIBDORF (1976)

Die Vaskularisation der Pektoralismuskulatur
bei der Reisetäubchen (Columba Livia, Gmelin 1789)
im Hinblick auf intramuskuläre Applikation von
Medikamenten.

Der praktische Tierarzt 2, 71 - 74

PSCHYREMBEL, W. (1969)

zitiert aus: Klinisches Wörterbuch

Walter de Gruyter u. Co., S. 62

PUTNAM, F. W. (1965)

"Structure and Function of the Plasma Proteins".
Kapitel 14 in "The Proteins" von H. Neurath,
Vol. 3, 2. Auflage

Academic Press, New York, N.Y.

RITSCHER, W. A. (1973)

Angewandte Biopharmazie

Wiss. Verlagsgesellschaft M.B.H., Stuttgart

RODWELL, A. (1969)

Nutrition and metabolism of the Mycoplasmas.

in: L. HAYFLICK: The Mycoplasmatales
and their L-Phase of Bacteria.

North Holland Publishing Company, p. 413 - 451

SCHANKER, L. S. (1964)

"Physiological Transport of Drugs"

in: "Drug Research" by Harper, N. J.,
and Simmonds, A.B.,

Academic Press, London und New York Vol. I, S. 76

SCHERER, W. (1969)

Grundlagen der allgemeinen Pharmakologie

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

SCHELLNER, H. P. (1970)

Blutbild, Hämatokrit und elektrophoretische
Auftrennung im Polyacrylamidgel von Seren
gesunder Brieftauben.

BMTW 13, 255

SCHERMER, S. (1958)

Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere.
2. Auflage

Barth-Verlag, Leipzig

SCHULTZE, H. E. und K. HEIDE (1960)

Der neueste Stand der Proteinforschung
in: Medizinische Grundlagenforschung, Bd. III,
Herausgegeben von K. Bauer

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

SMITH, P. F. (1971)

Interaction of Mykoplasmas with their
environment.
in: P. F. Smith: The Biology of Mycoplasmas

Academic Press New York and London, p. 182 - 197

STUDENT: siehe van der Waerden

TEICHMANN, B. (1976)

Tetracyclinblutspiegelbestimmungen bei Nymphen-
sittichen (*Nymphicus hollandicus*)

Diss. ~~med. vet.~~ München

VOGEL, K. (1970)

Die Taube

VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin

WACHENDÖRFER, G. (1970)

Hinweise zur Bestimmung des Chlortetracyclin-
spiegels in Blut und Geweben von Psittaciden
und Futterproben, sowie zur Technik der Blut-
entnahme.

DTW. 77, 553 - 576

WAERDEN VAN DER, B.L. (1965)

Students Tests aus: Mathematische Statistik,
Tafel 7

Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

WALLHÄUSER, K. H. und H. SCHMIDT (1967)

Sterilisation - Desinfektion - Konservierung.
Chemotherapie - Verfahren - Wirkstoffe -
Prüfungsmethoden.

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

WALTER, M. und L. HEILMEYER (1969)

Antibiotika - Fibel,
3. Auflage

Georg Thieme Verlag, Stuttgart

WEHNER, A. (1930)

Zur Methodik der Blutentnahme bei Hühnern.

DTW 38, 24

WUHRMANN, F. und H. H. MÄRKI (1963)

Leukozyten, Serumproteine und retikulo-
endotheliales System.

Schweiz. med. Wschr. 90, 1003

L E B E N S L A U F

Am 1. Juni 1948 wurde ich, Kuno-Alexander von Plocki, als Sohn des Tropenlandwirts Kuno von Plocki und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Doose, in Bobeck, Schleswig-Holstein, geboren.

Nach 4-jähriger Grundschulzeit an der Karlschule in Heilbronn besuchte ich das Theodor-Heuss-Gymnasium in Heilbronn. Dort legte ich 1968 die Reifeprüfung ab. Anschließend absolvierte ich eine 2-jährige Militärdienstzeit bei der Marine.

Im Wintersemester 1970 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München.

Die Approbation als Tierarzt erhielt ich im Januar 1976.

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 1974 - 1976.

Für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung meiner Arbeit möchte ich Frau Prof. Dr. I. Gylstorff sehr herzlich danken.

Frau Dr. Gerlach gilt mein besonderer Dank für die hilfreiche Unterstützung und die vielen Anregungen während der Versuche und bei der Auswertung der Ergebnisse.

Frl. Dr. Winteroll, sowie allen anderen Institutsangehörigen herzlichen Dank für die gute Zusammenarbeit.

Bei Frau Prantl und Frl. Straub bedanke ich mich für ihre Hilfsbereitschaft.

